

Aus dem
Medizinischen Zentrum der Radiologie
Klinik für Strahlendiagnostik
(Direktor: Prof. Dr. K. J. Klose)
Klinikum der Philipps-Universität Marburg

**EVALUATION DER GENEXPRESSION UNTERSCHIEDLICH
STIMULIERTER VASKULÄRER BOVINER MUSKELZELLEN**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
INA SCHNIEDER
geb. HOENE
aus Köln

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-
Universität Marburg am 14. November 2002

gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Klose

Correferent: PD Dr. Herzum

Für meine Eltern

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Therapiemöglichkeit der Gefäßstenose durch Perkutane Transluminale Angioplastie – und die Komplikationen	3
2.2	glatte Muskelzellen – Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC), Entwicklung und phänotypische Veränderung nach PTA	7
2.3	Wachstumsfaktoren und Nitroprussidnatrium	10
3	Zielsetzung der Arbeit	15
4	Material und Methoden	16
4.1	Zellkultur und Gewinnung von RNA	16
4.2	Oligonukleotide und Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion 19	
4.3	Reamplifikation und Klonierung von Polymorphismen	22
4.4	Spezifische Reverse Transkriptions PCR	25
5	Ergebnisse	27
5.1	Nachweis glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs)	27
5.2	Auswertung der Migration von VSMCs	28
5.3	Qualitative und quantitative Beurteilung der RNA	29
5.4	RAP-PCR – Darstellung ausgewählter Polymorphismen	30
5.5	Reamplifikationsprodukte	35
5.6	Klonierung und Sequenzierung	36
5.7	Sequenzanalyse und deren spezifischer Nachweis in der PCR- Reaktion	37
6	Diskussion	43
6.1	RAP-PCR als Methode	44
6.2	Protein p97	45
6.3	Extrazellulärmatrix und Laminin B2	48
6.4	Limitationen der vorliegenden Arbeit	50
7	Zusammenfassung	52
8	Literaturverzeichnis	55
9	Danksagung	71

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alle Einheiten wurden nach dem internationalen Standard (SI-Einheiten) abgekürzt:

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
E.coli	Escherichia coli
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor, endothelialer relaxierender Faktor (= NO)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
LB	Luria Broth
Lsg.	Lösung
min	Minute
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
NaAc	Natriumacetat
NO	Stickstoffmonoxid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor, Blutplättchen Wachstumsfaktor
RAP-PCR	RNA Arbitrarily Primed Polymerase Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SNP	Sodiumnitroprusside/Nitroprussidnatrium
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit/Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid

2 EINLEITUNG

2.1 Therapiemöglichkeit der Gefäßstenose durch Perkutane Transluminale Angioplastie – und die Komplikationen

Herz-Kreislaufkrankungen und somit auch die Atherosklerose als Hauptfaktor der myokardialen und zerebralen Infarkte, zählen in West Europa und den USA zu den häufigsten Todesursachen (Kannel, 1998).

Der Begriff der Arteriosklerose, oder heute auch Atherosklerose, wurde im Jahre 1835 erstmalig in einer Publikation von Lobstein erwähnt und beschrieb die damals bereits häufig gefundenen krankhaften Veränderungen der Arterienwand (nach Lobstein, 1835).

Heute versteht man unter dem Begriff der Atherosklerose die sehr komplexen Wechselwirkungen zwischen vermehrter Fetteinlagerung, den Endothelzellen, zirkulierenden und gewebsständigen Entzündungsmediatoren, Thrombozyten und glatten Muskelzellen, die mit vielfältigen Veränderungen der Media als auch der Intima der Arterien verbunden sind (Dartsch, 1992).

Die Ätiologie und Pathogenese dieser sowohl strukturellen als auch funktionellen Veränderungen in der Gefäßwand, sind bis heute nicht vollständig verstanden. Viele unterschiedliche Einzelbeobachtungen haben jedoch zu zahlreichen Theorien über die Entstehung der Atherosklerose geführt. Durch das Zusammentreffen einzelner bekannter Risikofaktoren, wie z.B. Nikotinabusus, Adipositas, langfristig bestehende arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und erhöhte Blutfette bzw. -cholesterin (hierbei insbesondere das erhöhte und oxidativ veränderte LDL) (Orford et al., 2000), bilden sich in der Arterienwand fibröse Plaques, die sich aus den oben bereits genannten Bestandteilen zusammenfügen. Diese Plaques nehmen im Laufe der Zeit an Größe zu, so daß es schließlich zur klinisch auffälligen Gefäßobstruktion, bis hin zum völligen Gefäßverschluß, kommen kann.

Abhängig von der Lokalisation der Stenose ist die therapeutische Maßnahme der Wahl häufig die Perkutane Transluminale Angioplastie (PTA), die 1964 erstmals von Dotter und Judkins (Dotter, Judkins, 1964) beschrieben wurde. Seit der Entwicklung des Ballonkatheters 10 Jahre später durch Grüntzig (Grüntzig, 1974), konnten die primären Behandlungserfolge der PTA wesentlich gesteigert werden, so daß heute mit modernen Techniken primäre Erfolgsraten von über 90% erreicht werden (Bauters et al., 1998).

Bei der perkutanen transluminalen Angioplastie wird zunächst über einen arteriellen Zugang eine Angiographie des betroffenen Gefäßes angefertigt. Danach erfolgt das Vorschieben eines Führungsdrahtes durch den stenosierte Gefäßabschnitt. Über den Führungsdraht wird dann ein Ballonkatheter entsprechender Größe in das obliterierte Segment vorgeschoben. Anschließend wird der Ballonkatheter über die Gesamtlänge der Stenose hin inflatiert, wodurch es zu einer Frakturierung atherosklerotischer Plaques mit oder ohne Mediadisektion kommt (Block et al., 1981).

Ein therapeutisches Problem bleiben die Rezidivraten, die entsprechend der Einteilung der American Heart Association (AHA) nach Lokalisation, Länge und Typ der Primärläsion unterschiedlich hoch sind. Nach der AHA wird eine Klassifikation der femoropoplitealen Erkrankung in vier Kategorien vorgenommen. Kategorie 1 umfasst Läsionen, bei denen es sich um eine einzelne Stenose kleiner 5 cm oder aber einen einzelnen Verschuß kleiner 3 cm handelt, wobei weder der Abgang der A. femoralis superior, noch Arterien distal der A. poplitea betroffen sein dürfen. Patienten dieser Kategorie haben nach 12 Monaten deutlich niedrigere Restenoseraten (< 4%) als Patienten der höheren Kategorien, bei denen eine oder mehrere Primärstenosen oder -verschlüsse vorliegen können. Die Restenoserate liegt hier im Bereich zwischen 20-35% nach 12 Monaten (Clark et al., 2001, Casterella et al., 1999). Diese Restenosen machen bei der Mehrzahl der Patienten Reinterventionen notwendig und

tragen damit zur Morbidität und Mortalität der PTA bei. Neben den thrombotischen Frühverschlüssen und der relativ langsamen Progression der Grunderkrankung spielt dabei der Prozeß der traumatisch induzierten Lumeneinengung durch vermehrte Zellproliferation und Gewebsumbau eine wichtige Rolle. Dieser Prozeß wird als Restenose im engeren - und hier gebrauchten - Sinne bezeichnet (Alfke et al., 1996).

In den letzten Jahren wird vermehrt nach alternativen Verfahren zur PTA, bzw. nach Therapieansätzen gesucht, um die hohe Reinterventionsrate nach primären gefäßeröffnenden Maßnahmen zu senken. Als mögliche Alternative zur PTA ist die Hochfrequenzrotationsangioplastie, die Excimer-Laser-Koronarangioplastie (Hombach et al., 1995). und die Applikation von Stents zu erwähnen (Palmaz et al., 1988, Strecker et al., 1990.) Die genannten Verfahren befinden sich allerdings entweder noch in der Erprobung, oder aber sie konnten bisher keine wirkliche Verbesserung der Restenoserate bieten. Zusätzlich findet man mitunter wesentlich höhere primäre Komplikationsraten als bei der PTA, wie z.B. die höhere Thrombosierungsrate nach Applikation von intraluminalen Stents (Drechsel et al., 1998). Parallel wird nach Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention nach Angioplastie gesucht, um die Rate der Restenosen niedrig zu halten. Die Therapie mit niedrig dosierter Acetylsalicylsäure ist heute die klinisch gebräuchlichste Form der medikamentösen Prophylaxe thrombotischer Frühverschlüsse (Schwartz et al., 1988), weiterhin werden auch Heparin oder Vitamin-K-Antagonisten zur Vorbeugung der Restenose gegeben (Böger et al., 1995). Auch Ca-Antagonisten, Fischöle, ACE-Inhibitoren, Steroide, Colchicin und Östrogene wurden auf ihre antiproliferative Wirkung nach PTA hin untersucht, wobei die entsprechenden klinischen Studien keinen überzeugenden Erfolg erbringen konnten (Drechsel et al., 1998). Eine erst kürzlich durchgeführte Doppel-Blind Studie hat jedoch gezeigt, daß bei der regelmäßigen Einnahme von Pravastatin (40mg täglich) eine signifikant (22%) niedrigere Restenoserate in der PTCA zu beobachten war, als in

der Placebogruppe, so daß es sich hier offensichtlich um eine sinnvolle medikamentöse Unterstützung in der Prävention der Restenose handelt (Mulder et al., 2000).

Der Pathomechanismus der Restenose nach Angioplastie stellt eine segmental begrenzte Wundheilungsantwort auf ein kontrolliertes Trauma der Gefäßwand dar. Klinisch kündigt sich die Restenose häufig durch das erneute Auftreten der typischen Beschwerden an. Im Rahmen der Restenose finden eine Vielzahl interaktiver Prozesse wie Zelladhäsion, Koagulation, Gefäßkontraktion, Zellmigration, Zellproliferation und Synthese von Extrazellulärmatrix statt. Bei all diesen Reaktionen handelt es sich prinzipiell um normale physiologische Reaktionen. Der Unterschied zwischen der physiologischen Wundheilung und der pathologischen Restenose liegt im Ausmaß und in der Dauer der Reaktion (Hombach et al., 1995).

Durch die Angioplastie als Stimulus kommt es zu einer Zerstörung endothelialer und subendothelialer Strukturen. Die Traumatisierung der Media mit Ruptur der Lamina elastica interna bewirkt eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren, insbesondere PDGF und bFGF aus Thrombozyten, Endothelzellen, Leukozyten, kontraktile glatten Muskelzellen und anderen Zelltypen (Nabel et al., 1993). Weiterhin kommt es unter anderem zu einer vermehrten Expression der Gene, die für Proteine der Extrazellulärmatrix, wie Elastin und Kollagene, codieren, wie in zahlreichen Tierversuchen gezeigt werden konnte (Tai et al., 2000). Parallel zur beginnenden Migration wandeln sich die überwiegend kontraktile glatten Muskelzellen zum sezernierenden und organellenreicheren Phänotyp der VSMCs in Intima und Media, um. In diesem Stadium liegen unterschiedliche Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren vor, wobei Expressionsdauer, Zusammenwirken und Expressionsmaxima an humanem Gewebe allenfalls partiell bekannt sind (z.B. PDGF, PDGF-R, FGF, FGF-R u.a.) (Bauriedel et al., 1994). Wenige Tage nach Angioplastie kommt es zu

einer verstärkten Bildung von Extrazellulärmatrix. Glatte Muskelzellen synthetisieren und sezernieren Matrixproteine, wie Kollagene und Glykoproteine, die allmählich zu einer starken Volumenzunahme der neu formierten Plaques führen. Experimentelle Daten zeigen, daß der Ablagerung von Extrazellulärmatrix eine führende Rolle in der Entstehung der Restenose zukommt und daß Migration und Proliferation der VSMCs durch die extrazelluläre Matrix beeinflusst werden (Schwartz, 1997).

2.2 Glatte Gefäßmuskelzellen – Vascular Smooth Muscle Cells (VSMCs), Entwicklung und phänotypische Veränderung nach PTA

Die großen arteriellen Gefäße des Embryos entstehen aus dem Mesoderm, wobei mesenchymale Zellen anfangs einen flüssigkeitsgefüllten Raum bilden, der von Endothelzellen ausgekleidet wird. Anschließend häufen sich zusätzliche mesenchymale Zellen an, die sich zu glatten Muskelzellen differenzieren (Langman, 1989).

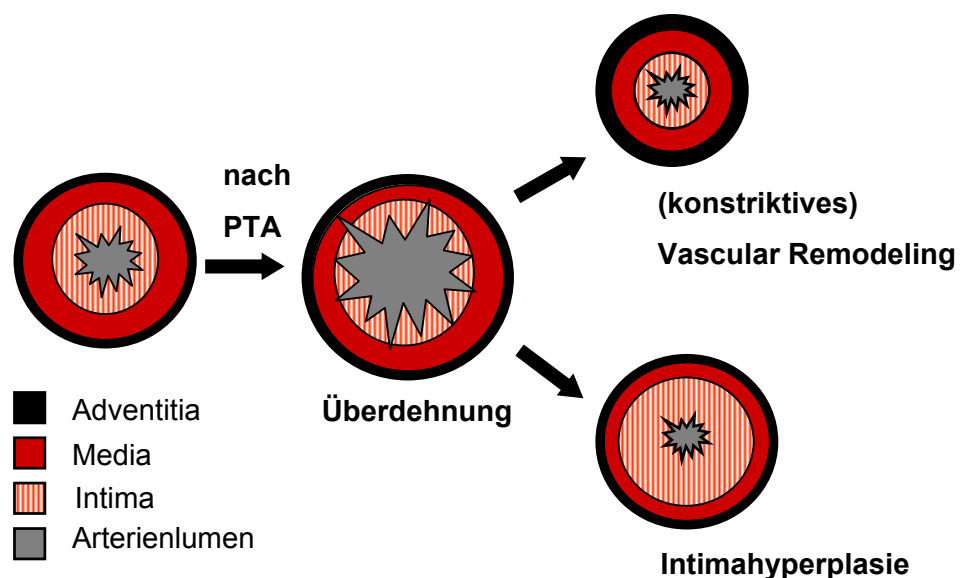
Während der Fetalzeit und in der frühen postnatalen Phase haben glatte Muskelzellen große Ähnlichkeit mit aktivierten Fibroblasten (Myofibroblasten), da sie über ein ausgedehntes granuläres endoplasmatisches Retikulum, einen auffälligen Golgi-Apparat und über nur wenige Myofilamente verfügen. (Thyberg et al., 1995). Im weiteren Reifungsprozeß proliferieren die glatten Muskelzellen und sezernieren Extrazellulärmatrix, wie z.B. Kollagen und Elastin und Proteoglykane.

Beim Erwachsenen besteht die *media* der Gefäßwand aus mehreren Schichten hochdifferenzierter glatter Muskelzellen, die konzentrisch angeordnet sind. Die sezernierenden Organellen der Zellen sind geschrumpft, während die Myofilamente nun den größeren Anteil des Zytoplasmas einnehmen. Die glatte Muskelzelle schränkt ihre proliferierende und sezernierende Tätigkeit zugunsten ihrer Kontraktionsfähigkeit stark ein. Aufgrund dieser Entwicklungen, unterscheidet man zwischen dem sezernierenden und kontraktile Typ der

glatten Muskelzelle.

Der hochdifferenzierte kontraktile Zelltyp des Erwachsenen verfügt über das Potential, bei Bedarf wieder in den hauptsächlich sezernierenden Phänotyp überzugehen, den man sonst beim Embryo oder auch heranwachsenden Organismus findet. Begünstigt wird der Übergang vom kontraktilen zum sezernierenden Typ durch Beschädigung der Basalmembran. Diese besteht aus einem feinfädigen Netzwerk aus Typ IV Kollagen, das hier keine Fibrillen bildet, sondern eine Verbindung mit mehreren nichtkollagenen Glykoproteinen, insbesondere dem Laminin, eingeht (Leonhardt, 1990). Ist die Basalmembran und Intima nicht mehr intakt, kommt es zum Kontakt der glatten Muskelzellen mit Makromolekülen in der Blutbahn, bzw. mit Wachstumsfaktoren, die in der Gefäßwand, von anderen Zellen, oder unter Umständen sogar von den glatten Muskelzellen selber produziert werden, so daß die Stimulation zur Umwandlung vom kontraktilen zum sezernierenden Typ in Gang gesetzt wird (Forsyth et al., 1997).

Die Analyse und Erforschung der Pathogenese restenotischer Läsionen haben zu zwei unterschiedlichen Ansätzen in der Erklärung der Restenoseentstehung geführt. Beide Mechanismen, die Intimahyperplasie, als auch des Vascular Remodeling führen letztlich zu einer Lumenreduktion des betroffenen Gefäßes (Post et al., 1994).



2.2.1 Intimahyperplasie

Bei der Intimahyperplasie kommt es aufgrund einer Verletzung der Endothelschicht zu einer entzündungsähnlichen Reaktion innerhalb der Gefäßwand. Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß die hyperplastische Reaktion der Intima mit dem Schweregrad des Angioplastie-induzierten Traumas positiv korreliert (Farb et al., 1999, Rogers et al., 1996). Durch Kontakt mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, kommt es in der Media der Gefäßwand zu einer Umwandlung des kontraktiven Typs der glatten Muskelzelle in den sezernierenden Typ. Die anschließende Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen, gemeinsam mit verstärkter Produktion von Extrazellulärmatrix führt dann zu einer Lumeneinengung. Die von den glatten Muskelzellen produzierte Extrazellulärmatrix besteht, wie schon oben beschrieben, aus verschiedenen Kollagentypen, Elastin, Proteoglykanen und Glykoproteinen (Isner, 1994). Der Gehalt der einzelnen Matrixkomponenten im Restenoseprozeß ist auch heute noch schlecht definiert. Der Arbeitsgruppe Tai et al. gelang es jedoch mittels PCR-Reaktionen am Tiermodell aufzuzeigen, daß mindestens 81 verschiedene Gene an der Synthese der Extrazellulärmatrix beteiligt sind. Von diesen Genen ließen sich insgesamt 68 im Anschluß an eine Ballondilatation nachweisen, 47 Gene zeigten zu sieben verschiedenen Zeitpunkten im Beobachtungszeitraum von 28 Tagen eine signifikante Expressions-veränderung (Tai et al., 2000).

2.2.1 Vascular Remodeling

Guzman et al. gelang es 1996 in einer experimentellen Studie aufzuzeigen, daß die Verdickung der Intima zu keiner signifikanten Lumeneinengung des Gefäßes, zumindest im Sinne der Restenose, führte (Guzman et al., 1996). Vielmehr findet man bei dem Prozeß, den man als Vascular Remodeling bezeichnet, über einen Zeitraum von mehreren Wochen nach PTA eine Reduktion des Gesamtdurchmessers der Arterie.

PTA-bedingte Veränderungen der Strömungsverhältnisse führen dabei zu Umbauvorgängen innerhalb der Gefäßwand. Bereits 1987 beschrieb Glagov die grundsätzliche Fähigkeit der arteriosklerotischen Gefäße, sich bis zu einer Stenosierung von 40% kompensatorisch zu erweitern (Glagov et al., 1987). Dieser Mechanismus des erweiternden Remodelings scheint jedoch nach Angioplastie gestört zu sein. Einerseits kann ein durch das Trauma der PTA hervorgerufener erhöhter Sympatikotonus zu einem Gefäßspasmus führen, andererseits sind auch elastische Rückstellkräfte der Gefäßwand (elastic recoil) zu berücksichtigen (Klues et al., 1997, Höfling et al., 1997). Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, daß ein inadeguater Erweiterungsmechanismus, sowie ein konstriktiver Prozeß für die Restenosierung verantwortlich gemacht werden kann (Schwartz, 1998; Kakuta et al., 1994). Dieser Vorgang ist höchstwahrscheinlich bedingt durch noch nicht vollständig verstandene plastische und strukturelle Veränderungen in der Adventitia der Arterienwand (Post et al., 1994).

2.3 Wachstumsfaktoren und Nitroprussidnatrium

Die komplexen Vorgänge, die zur Migration und Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima führen, können heute noch nicht vollständig erklärt werden. Es ist jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Wachstumsfaktoren beschrieben, die als Reaktion auf das Barotrauma durch den Katheter, sowohl von Thrombozyten als auch von glatten Muskelzellen freigesetzt werden. Auf der Suche nach möglichen Initiierungs- und Steuerungsmechanismen dieser zellulären Ereignisse konnte durch in situ-Hybridisierung in zellreichen Intima-Arealen koronarer Restenosen von behandlungsbedürftigen Patienten PDGF-A mRNA nachgewiesen werden (Bauriedel et al., 1994), nachdem bereits in operativ exzidierten Plaques der A. carotis spezifische Transkripte für PDGF-A, PDGF-B und PDGF-Rezeptor gefunden wurden und dabei mesenchymalen Intimazellen sowie Makrophagen zugeordnet werden konnten (Wilcox, 1991). Eine erhöhte Expression von bFGF und aFGF

sowie deren Rezeptoren, konnte immunhistochemisch in menschlichem Arteriosklerosegewebe bei Neovaskularisationsprozessen (Hughes et al., 1993) und – assoziiert mit Hyperzellularität von VSMCs – in koronaren Restenosen sowie in Primärläsionen mit klinischer Instabilität nachgewiesen werden (Flugelman et al., 1993).

Stimuliert man glatte Muskelzellen mit PDGF oder bFGF, so zeigen Muskelzellen, die aus Restenosegewebe gewonnen wurden, eine deutlich höhere Proliferationsrate als die Zellen, die aus Primärstenosegewebe gewonnen wurden. Es findet sich also eine erhöhte mitogene Stimulierbarkeit der glatten Muskelzellen durch spezifische Wachstumsfaktoren (Bauriedel et al., 1993).

Für die Relaxation einer arteriellen Gefäßwand benötigt man ein intaktes Endothel, da dort der sogenannte Endothelium Derived Relaxing Factor, EDRF, freigesetzt wird (Furchgott, 1996). Seit 1987 weiß man, daß es sich beim EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Palmer et al., 1987). NO führt durch Relaxation der glatten Muskelzellen zu einer lokalen Vasodilatation, hemmt die Thrombozytenaggregation ebenso wie die Proliferation und Migration der VSMCs (Loscalzo et al., 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Stimulierung der Zellkulturen drei Wachstumsfaktoren, sowie der NO-Donator Nitroprussidnatrium, ausgewählt.

2.3.1 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Der Name Platelet Derived Growth Factor (PDGF) beruht auf Forschungsergebnissen aus dem Jahre 1974 (Kohler et al., 1974; Ross et al., 1974). Damals nahm man an, PDGF wäre ausschließlich ein von Thrombozyten produzierter Wachstumsfaktor, heute jedoch weiß man, daß auch viele andere Zellen, wie z. B. VSMCs und Endothelzellen PDGF produzieren können (Newby et al., 1993).

Es sind zwei PDGF-Isoformen (A-Kette und B-Kette) bekannt, die Homo- oder Heterodimere bilden können (Ross et al., 1986). PDGF kann sich an

zwei verwandte Rezeptor-Tyrosin-Kinase, PDGF-Rezeptor-alpha und PDGF-Rezeptor-beta, binden und diese aktivieren (Heldin, 1992). In arteriosklerotischem Plaquematerial, sowie bei arteriellen Regenerations- und Reparatursprozessen konnte PDGF mRNA und Protein, sowie der PDGF-Rezeptor-beta nachgewiesen werden (Majesky et al., 1990, Ross et al., 1990). Wird der PDGF-Rezeptor durch seinen spezifischen Liganden stimuliert, überträgt er ein mitotisches wie auch ein chemotaktisches Signal (Jawin et al., 1992). Durch Phosphorylierung von Tyrosin-Residuen im zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors kommt es zur Aktivierung einer Kaskade von Signaltransduktionsmolekülen (Westermarck et al., 1990, Schlessinger et al., 1992). Durch die Blockade von PDGF mittels eines neutralisierenden Antiserums konnte in einem Angioplastiemodell der Ratte gezeigt werden, daß PDGF eine funktionelle Rolle bei der Akkumulation von glatten Muskelzellen in der neu gebildeten Intima spielt (Bilder et al., 1999; Ferns et al., 1991).

2.3.2 Fibroblasten Wachstumsfaktor, FGF

Die Wachstumsfaktoren bFGF (basic) und aFGF (acidic) gehören in die Familie der Heparin-bindenden Polypeptide. Sie vermitteln beide sehr ähnliche biologische Aktivitäten, jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung. Einige dieser Aktivitäten können mit der Restenose nach PTA in Verbindung gebracht werden. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß beide Wachstumsfaktoren in vitro von VSMCs synthetisiert werden und gleichzeitig mitogen auf diese Zellen wirken (Gospodarowicz et al., 1988). bFGF stimuliert nach seiner Freisetzung durch mechanische Verletzung eines Gefäßes die Proliferation sowie die Migration der glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima. Zusätzlich reguliert bFGF in Gegenwart von Heparin die Expression von Makromolekülen der Extrazellulärmatrix und beeinflusst damit die frühe Intimahyperplasie (Kennedy et al., 1997; Lindner et al., 1991).

Um biologisch aktiv werden zu können, bindet der bFGF mit hoher Affinität

an einen seiner spezifischen Rezeptoren. Insgesamt vier unterschiedliche Rezeptoren, FGFR 1 bis 4, konnten bisher durch cDNA Klonierung und Sequenzierung identifiziert werden (Givol et al., 1992). Man findet sie nach einer Gefäßverletzung auf der Oberfläche von verschiedenen Zellen, insbesondere auch auf glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Die genaue Verteilung dieser unterschiedlichen Rezeptoren *in vivo* ist weitestgehend unbekannt, lediglich für den FGFR 1 konnte gezeigt werden, daß er aFGF und bFGF mit hoher Affinität bindet (Brothers et al., 1995; Dionne et al., 1990).

2.3.3 Nitroprussidnatrium, SNP

Als Nitrate oder Nitro-Verbindungen werden im medizinischen Sprachgebrauch, chemisch nicht exakt, Ester der salpetrigen Säure und der Salpetersäure mit antianginöser Wirkung zusammen gefaßt. Die Wirkung der Nitrate ist grundsätzlich gleich, der Unterschied zwischen den Präparaten liegt in ihrer Pharmakokinetik, d.h. sie unterscheiden sich vor allem durch Wirkungseintritt und Wirkungsdauer. Die eigentliche Wirksubstanz der Nitrate ist das Stickstoffmonoxid (NO) welches durch reduzierende Biotransformation, unter Beteiligung von Cytochrom P-450, gewonnen wird (Mutschler, 1996). NO stimuliert die cytosolische Guanylatcyclase, welche dann die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert. cGMP führt dann zu einer Abnahme der intrazellulären Calciumionenkonzentration, wodurch es zu einer Erniedrigung des Gefäßtonus kommt (Carr et al., 2000). Wie bereits oben erwähnt wirkt NO nicht nur vasodilatierend und proliferationshemmend sondern inhibiert die durch basischen Fibroblastenwachstumsfaktor induzierte Migration von bovinen, glatten Muskelzellen (Alfke et al., 2000). Glatte Muskelzellen sind selber in der Lage, Stickstoffmonoxid zu synthetisieren, allerdings nur, wenn sie mit Cytokinen oder Lipopolysacchariden stimuliert werden (Nakayama et al., 1992). Zur vermehrten Freisetzung von Cytokinen

kommt es wiederum nach Verletzung des Endothels bei der PTA. Bei NO-Synthese der VSMCs handelt es sich somit anscheinend um den Versuch, der eigenen Proliferation und Migration aus der Media in die Intima nach Gefäßtrauma, entgegenzuwirken (Dubey et al., 1995).

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die hohe Rezidivrate nach Gefäßwandinterventionen zeigt die Notwendigkeit, die pathogenetischen und molekularbiologischen Prozesse wie z.B. die beteiligten Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und intrazellulären Transduktionswege der Restenose besser zu verstehen, um somit in Zukunft erfolgversprechendere therapeutische Strategien entwickeln zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Stimulation von bovinen glatten Muskelzellen mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und Nitroprussidnatrium, relevante Gene nachzuweisen, die von den stimulierten VSMCs, im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen, vermehrt oder vermindert exprimiert werden.

Bei der angewandten Methode werden mit Hilfe von kurzen, arbiträren Primern in der PCR-Reaktion, sogenannte RNA-Fingerprints (McClelland et al., 1995) angefertigt. Vorteil dieser Methode ist, daß man (auch bisher unbekannte) Transkripte auffinden kann, die, wie in der vorliegenden Arbeit, nach unterschiedlicher Behandlung der Zellen in der Zellkultur, differentiell exprimiert werden.

Nach Analyse der hoch- bzw. runterregulierten Banden durch Reamplifikation, Klonierung und Abgleich mit der internationalen Datenbank, sollte dann nach Zusammenhängen von Proliferation und Migration der VSMCs, aus der Gefäßmedia in die Intima, und der Restenosebildung nach PTA in der Literatur gesucht werden.

Neben der Etablierung der oben genannten Methode an VSMC sollen diese Ergebnisse nicht nur dem besseren Verständnis der Restenosebildung nach PTA dienen, sondern auch Hinweise auf eine mögliche therapeutische Beeinflussung ergeben.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Zellkultur und Gewinnung von RNA

Zur Gewinnung der glatten Gefäßmuskelzellen (Vascular Smooth Muscle Cells: VSMCs) wurde unmittelbar nach der Schlachtung des Rindes auf dem Schlachthof ein Stück der bovinen Aorta durch den Ausweider entnommen und in ein Gefäß mit kaltem PBS Puffer gegeben. Danach erfolgte schnellstmöglich der Transport ins Labor, wo die bovine Aorta unter sterilen Bedingungen von adventitiellem und periadventitiellem Gewebe befreit, mit PBS Puffer bei Raumtemperatur gespült, anschließend aufgeschnitten und in einen Rahmen gespannt wurde. Die Intima der Aorta wurde mit 0,2% Kollagenase (Boehringer, Mannheim) bedeckt und für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Entfernen der Endothelzellen durch erneutes Spülen mit PBS Puffer und Verwendung eines Zellschabers wurden mit einem Skalpell kleinste Gewebestückchen (1-2 mm) aus der nun freiliegenden Media ausgeschnitten. Diese Stückchen wurden in 25 ml Kulturflaschen (Sarstedt, Berlin) zusammen mit einem Medium Mix aus Iscove's Modifiziertem Dulbecco's Medium und Nutrient Mixture Ham's F-12 im Verhältnis 1:1 mit FCS (Biochrom KG, Berlin) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In den ersten 5 Tagen wurde täglich 1ml Medium Mix, versetzt mit 50% FCS, zugegeben. In den anschließenden Wochen wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel mit nur noch 10% FCS durchgeführt. Sechs bis acht Tage nach Inkubationsbeginn wuchsen die ersten Muskelzellen aus dem Gewebestückchen heraus. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Gewebestück entfernt, die Kultur mit PBS gewaschen und die Zellschicht mit 0,25% Trypsin (Gibco, Eggenstein) für 30min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Durch Zugabe von 5ml Medium-Mix (10% FCS) wurde das Trypsin inhibiert und die Zellen gewaschen, um sie anschließend in 20ml tubes zu

überführen und abzuzentrifugieren. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen dann auf 4 weitere Kulturflaschen verteilt, erneut inkubiert, bis Konfluenz erreicht war. Für die folgenden Migrations- und Stimulationsversuche wurden ausschließlich Zellen der Passage 4 - 6 benutzt.

4.1.1 Überprüfung der Zellkultur durch spezifische Antikörper

Um sicher zu stellen, daß es sich bei der Zellkultur tatsächlich um Muskelzellen handelte, wurde ein indirekter Antikörpertest, ausschließlich gerichtet gegen muskuläres alpha-Actin, durchgeführt. Hierzu wurden Zellen aus der ersten Passage in eine Petrischale gegeben, in der ein beschichteter Objektträger (Thermanox, Nunc Inc., IL, USA) lag. Die Zellen wurden mit Medium-Mix bedeckt und für 24 Stunden bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert, bis sich vereinzelte Zellen auf dem Objektträger festgesetzt hatten. Der Objektträger wurde nun für 10 min an der Luft getrocknet, anschließend 10 min bei -20°C mit Aceton fixiert und dann erneut 10 min an der Luft getrocknet. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation des Objektträgers bei 37°C und 5%CO₂ mit dem Primärantikörper (Mouse Anti Human Muscle Actin, HHF 35, Dako, Hamburg), 1:50 verdünnt mit PBS und 1% bovinem Serumalbumin (Sigma, Deisenhofen). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Rabbit Anti-Mouse, Dako) in einer Verdünnung mit PBS und 1% Serumalbumin von 1:300 hinzugefügt, und der Objektträger erneut für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. In einem dritten Schritt wurde nun Streptavidin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase in einer Verdünnung von 1:200 hinzugegeben.

Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers, welcher wiederum an den Antigen-Primärantikörperkomplex bindet. Bei der anschließenden Färbung mit Dako Neufuchsin-Substrat bildeten die Konjugate der alkalische Phosphatase an der Stelle des gesuchten Antigens ein unlösliches rotes

Reaktionsprodukt, wodurch gezeigt werden konnte, daß es sich um Muskelzellen handelte.

4.1.2 Überprüfung der Migration

Für den Migrationsversuch wurden nach der modifizierten Boyden-Chamber-Methode je 2ml Medium, in der oben genannten Mischung, mit jeweils einem Wachstumsfaktor (PDGF-AA/-BB, bFGF, Pepro Tech EC LTD., GB) in einer Konzentration von 10ng/ml auf Six-Well Platten (Greiner, Frickenhausen) verteilt. Darauf wurde ein Falcon Cell Culture Insert (Porengröße 8µm) aufgesetzt und pro Membran 200 000 Zellen ausgezählt und aufgetragen, die dann für 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt und die obere Membranseite mit einem Schaber vorsichtig von möglichen Zellresten befreit. Danach wurde die Membran ausgeschnitten und umgedreht auf einen Objektträger gegeben, so daß die migrierten Zellen bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt werden konnten.

4.1.3 Zellstimulation und RNA Isolierung

Als Vorbereitung für die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-AA/BB und bFGF und dem NO-Donator Nitroprussidnatrium (SNP, Sigma, St. Louis, USA) wurden Zellen auf neun Kulturflaschen verteilt. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Zellen vor der Stimulierung mit den Wachstumsfaktoren durch 24 stündige Inkubation mit serumfreiem Medium in ihrem Wachstum arretiert.

Die Zellen wurden dann mit jeweils einem der oben genannten Wachstumsfaktoren in einer Konzentration von 10ng/ml, bzw. mit 0,1mM Nitroprussidnatrium über eine bzw. sechs Stunden stimuliert. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen. Dazu

wurden die Zellen aus der Kulturflasche vorsichtig durch den im Mini Kit mitgelieferten Lysisbuffer abgelöst, in 2ml tubes hineinpipettiert und für 3min bei 10.000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue tubes überführt und mit 350µl Ethanol (70%) mit Hilfe der Pipette gut durchmischt. Das Lysat wurde dann auf die mitgelieferten Reinigungssäulen (Quiagen-RNeasy spin column) pipettiert und für 15sec bei 10.000U/min zentrifugiert. Die Säule wurden danach insgesamt drei mal mit mitgelieferten Reinigungspuffern versetzt und erneut abzentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die gereinigte RNA mit 50µl DEPC aus der Säule ausgewaschen (1min zentrifugieren bei 10.000U/min) und in 1,5ml tubes gesammelt. Als Kontrolle wurde RNA aus nicht stimulierten Zellen isoliert.

4.1.4 Qualitative und quantitative Beurteilung der RNA

Um die RNA in den nachfolgenden Versuchen mengenmäßig genau einsetzen zu können, wurden alle Proben im Photometer (Pharmacia-Biotech, Freiburg) in zwei Verdünnungen, 1:50 und 1:75 bei 260nm, gemessen. Bei diesem Meßvorgang wurde weiterhin auch die Ratio der RNA bestimmt, als Maß für die Reinheit der Proben. Anschließend wurde in Agarosegelen (1% Agarose, 1x TAE-Puffer (40mM Tris-Acetate, 2mM EDTA, pH 8,5)) mit 1xTAE als Laufpuffer bei 50V/45 min und folgender Färbung mit 0,01%igem Ethidiumbromid, sowohl die Qualität als auch Quantität der RNA unter UV Licht überprüft und photographisch dokumentiert.

4.2 Oligonukleotide und Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) und für die nachfolgende Polymerasekettenreaktion eingesetzt:

OPN 21	5' -ACC AGG GGC A-3'
OPN 24	5' -AGG GGC ACC A-3'
OPN 25	5' -GGG GCA CCA G-3'
OPN 27	5' -GGC ACC AGG G-3'
OPS 04	5' -CAC CCC CTT G-3'
OPS 05	5' -TTT GGG GCC T-3'
JUC 1A	5' -ACG AAG AAG AG-3'
HD 10	5' -AAG TCC TTC C-3'

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert.

4.2.1 cDNA-Erststrangsynthese

Die Umschreibung der mRNA in cDNA durch reverse Transkription (RT) wurde in einem Reaktionsgemisch, das 3,75µM Primer, 0,0625mM dNTP's, 50mM Tris-HCL (pH 8.3), 75mM KCL, 3mM MgCL₂, 10mM DTT (Gibco, Bethseda, USA), 200U M-MLV Reverse-Transkriptase (Gibco) enthielt, in einem Volumen von 20µl durchgeführt.

Die cDNA-Erststrangsynthese und alle weiteren Reaktionen wurden grundsätzlich pro mRNA in zwei Konzentrationen, 200ng und 250ng, vorgenommen, um konzentrationsabhängige Polymorphismen im Expressionsmuster zu vermeiden (McClelland et al., 1995).

Zuerst wurden die jeweiligen mRNAs zusammen mit dem entsprechenden Primer für 10 min bei 70°C denaturiert, dann auf Eis gestellt, während das restliche RT-Reaktionsgemisch, außer der M-MLV, hinzupipettiert wurde. Im Thermocycler (MJ Research Biozym, Karlsruhe) wurden die Proben vorsichtig auf 37°C erwärmt (20°C-45", 23°C-45", 26°C-45", 29°C-45", 31°C-30", 34°C-30", 37°C-30"), um dann die Reverse Transkriptase hinzuzugeben. Nach weiteren 60 min bei 37°C wurde M-MLV bei 95°C 2 min lang inaktiviert.

4.2.2 Zweitstrangsynthese

Für diese Reaktion wurden 3,75µM Primer, 0,065mM dNTP's, 3,75mM

MgCl₂ (Qiagen, Hilden), 1xReaktionspuffer (Qiagen, Hilden), DMSO 5%, 2,5U taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) und 10µl Erststrang in einem Gesamtvolumen von 30µl verwandt. Es wurde ein längerer, gefolgt von acht weiteren Zyklen, durchgeführt (94°C-2min, 24°C-5min, 72°C-5min, 8x [94°C-1min, 38°C-1min, 72°C-2min] 72°C-5min).

4.2.3 PCR Reaktionsbedingungen

Die anschließende Amplifikation wurde mit 3,75µM von jedem Primer, 0,25mM dNTP's, 1xReaktionspuffer, 1,875mM MgCl₂, DMSO 5%, 1U taq Polymerase und 10µl Zweitstrangvorlage in 32 Zyklen durchgeführt (94°C-2min, 31x [94°C-1min, 38°C-1min, 72°C-2min] 72°C-5min). Das Reaktionsvolumen betrug hier ebenfalls 30µl.

4.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch denaturierende Polyacrylamidgele (5% Polyacrylamid (Roth, Karlsruhe), 50%Urea, 10%APS, TBE (100mM Tris, 90mM Borsäure, 1mM EDTA, pH 8.3 bei 23°C), bei einer maximalen Leistung von 45 Watt (50°C) mit 1xTBE als Laufpuffer und einer Laufzeit von 90min, verwandt.

Die Silberfärbung der Gele, um die PCR-Produkte darstellen zu können, wurde in acht Schritten vorgenommen (Budowle et al., 1991):

- 5 min Fixierung in 10%igem Ethanol,
- 3 min Oxidierung in 1%iger Salpetersäure,
- kurzes Spülen mit aqua bidest,
- 20 min in 0,012M Silbernitrat
- kurzes Spülen mit aqua bidest,
- Reduktion in 0,28M Natriumcarbonat + 0,019% Formalin, bis Bandenmuster sichtbar werden
- 2 min in 10%iger Essigsäure zum Abstoppen der Reduktion
- 2 min in aqua bidest.

Anschließend wurden die Gele auf Chromatographiepapier getrocknet, um sie dauerhaft aufbewahren zu können.

Die dargestellten Bandenmuster der getrockneten Gele wurden nun auf Unterschiede hin genau betrachtet. Als polymorph wurden dabei solche Banden gewertet, die im Vergleich zu den Kontrollspuren stärker oder schwächer ausgeprägt waren. Nicht berücksichtigt wurden konzentrationsabhängige Unterschiede in der Bandenexpression.

4.3 Reamplifikation und Klonierung von Polymorphismen

Um die DNA der als polymorph gewerteten Banden für die nachfolgende Klonierung zu gewinnen, wurden die entsprechenden Stellen auf den Polyacrylamid-Sequenziergelen mit sterilen Kanülen vorsichtig "abgekratzt" (Stumm et al., 1997). Die Reamplifikation fand in einem PCR-Reaktionsgemisch, das 0,75µm von jedem Primer, 0,125mM dNTP's, 1xReaktionspuffer, 1,5mM MgCl₂ und 1 Unit taq-Polymerase enthielt, in einem Volumen von 20µl statt. Die PCR wurde mit insgesamt 30 Zyklen durchgeführt (94°C-4min, 29x [94°C-1min, 38°C-1min, 72°C-1min], 72°C-5min).

Die Reamplifikationsprodukte wurden anschließend auf denaturierende Polyacrylamidgele (5%) aufgetragen, erneut aufgetrennt und durch Silbernitratfärbung dargestellt.

4.3.1 Ausfällen der DNA und Vorbereitung der Ligation

Um die DNA der Reamplifikationsprodukte für die folgende Klonierung nutzen zu können, wurde das PCR-Produkt aus dem vorhergehenden Schritt mit 3M Natrium-Acetat und 100% Ethanol gefällt. Anschließend wurde bei 10.000U/min für 3min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde 2x in 70% Ethanol gewaschen, dann 5min an der Luft getrocknet und danach in 20µl aqua bidest gelöst.

Um die Ligationsreaktion mit glatten Enden ("blunt end ligation") zu

ermöglichen, mußten die überhängenden Adenin-Enden der PCR-Produkte zuerst komplementär vervollständigt werden. Dazu wurden 5µl der Reamplifikations-DNA mit 0,25mM dNTP's, 1xPuffer (Stratagene, Heidelberg), 2,5U Pfu-taq (Stratagene) in einem Reaktionsvolumen von 10µl für 30min auf 72°C erhitzt.

4.3.2 Verdau des pBluescript II KS+ Phagemid mit Eco RV

Bei diesem Restriktionsverdau wurde 1µg pBluescript II KS+ mit 10U Eco RV und 1xReaktionspuffer (Boehringer, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 20µl für zwei Stunden bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Dabei wurde der DNA-Doppelstrang aufgeschnitten und für die anschließende Ligationsreaktion vorbereitet.

4.3.3 Ligation der DNA in pBluescript II KS+/Eco RV

Die Ligation der blunt end DNA erfolgte mit 5µl DNA aus der Insert-polishing Reaktion zusammen mit 1µl pBluescript II KS+ Phagemid, verdaut mit Eco RV (Boehringer Mannheim), 10U Eco RV, 2U T4 Ligase (Gibco), 1xReaktionsbuffer (Zusammensetzung, Gibco) in einem Gesamtvolumen von 20µl bei 16°C über 16 h im Thermocycler.

4.3.4 Transformation kompetenter Bakterien und anschließendes Ausstreichen auf Platten

Kloniert wurde mit kompetenten E. coli des Bakterienstammes DH5α (F⁻, ϕ 80*dlacZ*Δ*M15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-I*, *hsdR17*, *supE44*, *felA1*, *deoR*, Δ((*lacZYA-argF*)*U169*).

Für die Transformation wurden die tubes der bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien zügig in der Hand aufgetaut und jeweils 100µl der Bakterienmasse zu 10µl des Ligationsansatzes in 20ml Reaktionsgefäße gegeben. Danach sofortige Inkubation auf Eis für 10 min., anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C im Thermoblock. Nach Zugabe

von 1ml LB-Medium (10g/l Select Peptone, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Natriumchlorid, Gibco) wurde die Bakterien-DNA für 1h bei 37°C im Rüttler kultiviert.

Während dieser einstündigen Inkubationszeit wurden Agar Platten, die LB-Medium und Ampicillin (Gibco, 100µg/ml) enthielten mit 2%igem Xgal (Roth) und 100mM IPTG (Roth) ausgestrichen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500µl der Bakterienmasse pro Petrischale ausgestrichen und für 12 bis 14 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gelagert. Danach wurden die Petrischalen für weitere 2 bis 4h bei 4°C aufgehoben, bis eine deutliche blau/weiß Unterscheidung der einzelnen Klone möglich war.

Pro Platte wurden sechs weiße Bakterienklone "gepickt", da diese das DNA-Insert enthalten sollten, und in jeweils 3ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin, 100µg/ml, Gibco) für weitere 12 bis 14 h bei 37°C im Rüttler kultiviert.

4.3.5 Plasmidpräparation aus transformierten Bakterien

Die Präparation der Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurde nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Hierzu wurden 1,5ml der Bakterienkultur in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (12000U/min, 5min). Das Bakterienpellet wurde in Lsg. I (50mM Glucose, 25mM TrisCl [pH 8], 10mM EDTA) resuspendiert, mit Lsg. II (0,2M NaOH, 1%SDS) versetzt und vorsichtig gemischt. Die alkalische Lyse der Bakterien erfolgt während der anschließenden Inkubation auf Eis (5min). Nach Zugabe von eiskalter Lsg. III (3M K-Acetat, 2M Essigsäure [pH 5,2]) und gründlichem Mischen durch mehrfachen Schwenken der Eppendorftubes wurden während der folgenden 15 minütigen Inkubation auf Eis bakterielle Proteine und chromosomale DNA ausgefällt. Anschließend wurde 5min bei 12000U/min abzentrifugiert, der wässrige Überstand dekantiert und mit eiskaltem EtOH, 100%, die DNA ausgefällt. Nach einmaligem Waschen des Pellets

in 70%igem Ethanol wurde die DNA in 50µl TE aufgenommen.

Im anschließenden Restriktionsverdau wurde die DNA mit dem Enzym Hind III (Boehringer, Mannheim) linearisiert, durch Agarosegelelektrophorese (1%) dargestellt und mittels einer positiven und einer negativen Kontrolle ausgewertet.

Zur quantitativen Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA wurde der Qiagen Mini Prep Kit 25 verwandt. Hierzu wurden die als positiv ausgewerteten Bakterienkulturen mit LB-Medium auf ein Volumen von 3ml aufgefüllt und für 12 bis 14h bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend nach den Vorschriften des Herstellers aufgearbeitet.

Die Sequenzierung der klonierten und aufgereinigten DNA erfolgte mit M13 Standard-Primern, welche die pBluescript poly-cloning side flankieren, bei der Firma MWG, Ebersberg, mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes.

4.4 Spezifische Reverse Transkriptions Polymerase-Ketten-Reaktion

Die spezifische RT-PCR wurde durchgeführt, um das Auftreten der subklonierten, polymorphen Banden mit ihrer Expression in den anfangs durchgeführten Polyacrylamidgelen zu vergleichen. Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für den spezifischen Nachweis der mRNA-Expression in der Reversen-Transkriptase-PCR (RT-PCR) genutzt:

β-Actin	f:	5' -CAT CCA GGC TGT GCT G-3'	Sequenzlänge:
	r:	5' -CGG CTG TGG TGG TAA AG-3'	209 bp
p97	f:	5' -CGT CAA AGG AAG AAC TGC T-3'	Sequenzlänge:
	r:	5' -AGG GGG ATG TCA ACC TC-3'	298 bp
Laminin B2	f:	5' -TGT TCA GGT CCA CTG TGT C-3'	Sequenzlänge:
	r:	5' -CAG GAA GCA GAA AAA GAG C-3'	196 bp
MR 18	f:	5' -GGG GAC ACA AAA CTG AGC-3'	Sequenzlänge:
	r:	5' -CCA ATC CAA AAA CAG AGA CA-3'	235 bp

MR 21 f: 5' -GGG GGG TTT GTG GAG T-3' Sequenzlänge:
 r: 5' -CCT GGG GAG GGA AGA T-3' 114 bp

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert.

Für den Erststrang wurden 250ng RNA, 0,03mM Random-Hexanucleotide (Boehringer Mannheim), 0,0625mM dNTP's, 10mM DTT, 50mM Tris-HCL (pH 8.3), 75mM KCL, 3mM MgCl₂ und 200U M-MLV RT eingesetzt.

Zuerst wurden die RNA und die Hexanucleotide für 10min bei 70°C denaturiert, dann auf Eis gestellt, während das restliche RT-Reaktionsgemisch, außer der M-MLV, hinzupipettiert wurde. Die Proben wurden für 10min bei Raumtemperatur inkubiert, um dann die Reverse Transkriptase hinzuzufügen. Danach kamen die Tubes für 60min bei 37°C in den Thermocycler und wurden abschließend für 2min auf 95°C erhitzt, um die M-MLV zu inaktivieren.

Die anschließende Polymerase-Ketten-Reaktion wurde mit 0,3µM Primer, 0,2mM dNTP's, 1x Reaktionspuffer, 1,5mM MgCl₂, 1U taq-Polymerase und 2µl Erststrang in einem Gesamtvolumen von 50µl mit 28 Zyklen durchgeführt. (94°C-4min, 27x [94°C-1min, 50°C-1min, 72°C-1min 30sek], 72°C-5min).

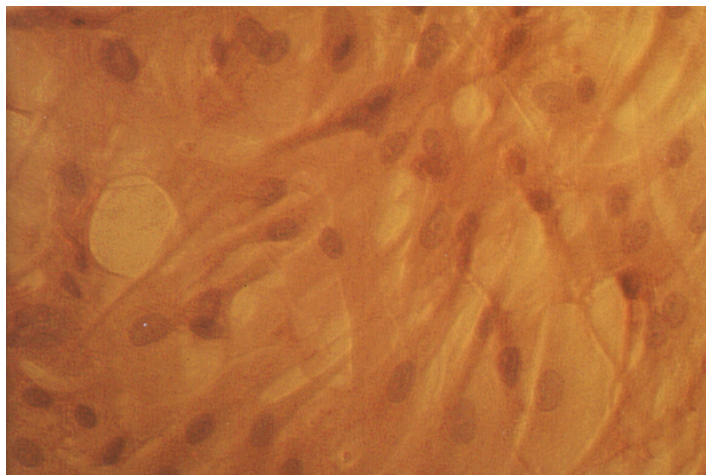
Die spezifischen PCR-Produkte wurden auf 1,5%ige Agarosegele mit 1xTAE als Laufpuffer bei 90V/45min geladen und nach anschließender Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht ausgewertet und photographisch dokumentiert.

Weiterhin wurden nicht-denaturierende Polyacrylamidgele mit anschließender Silberfärbung angefertigt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Nachweis glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs)

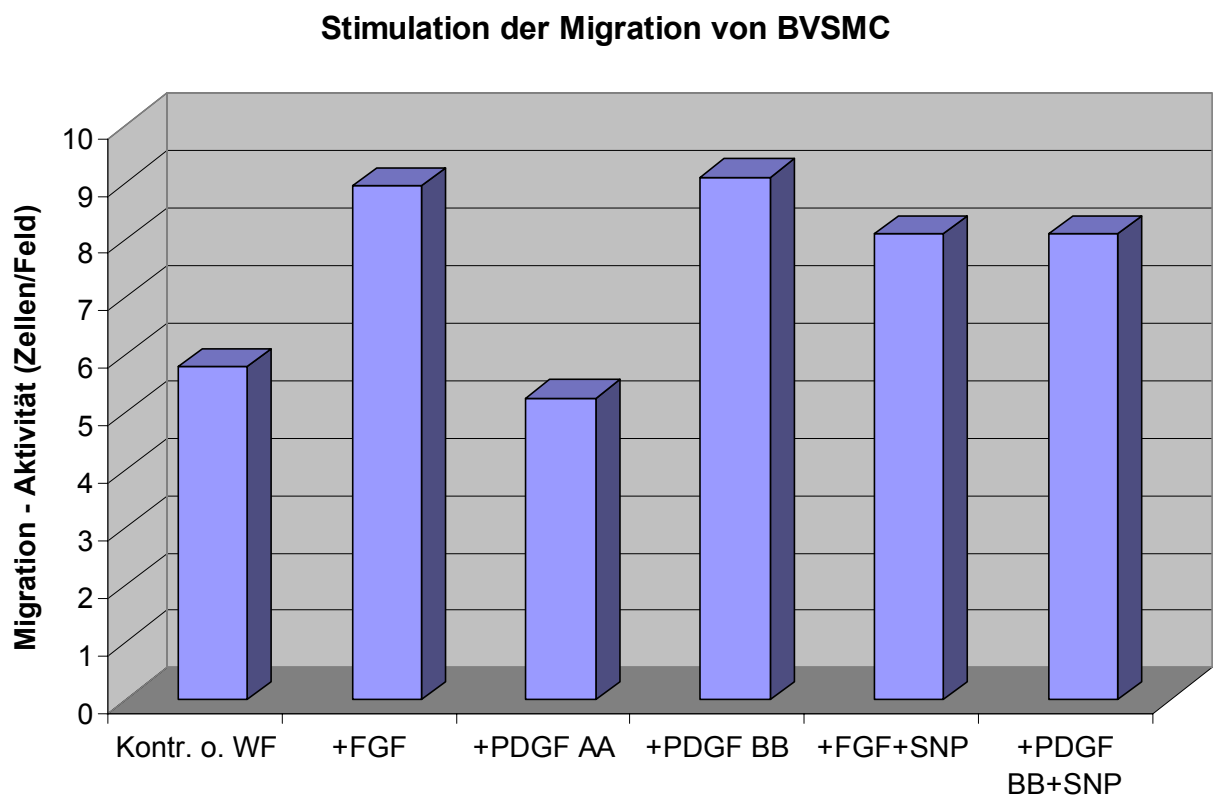
Um sicher zu stellen, daß es sich bei den gewonnenen bovinen Zellen tatsächlich um glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) handelt, führten wir einen indirekten Antikörpertest durch, der gegen muskuläres Alpha-Actin gerichtet war. Über verschiedene Schritte (s. 4.1.1.) lassen sich dabei glatte Muskelzellen, wie auf dem folgenden Photo gut zu erkennen, durch ein unlösliches dunkelrotes Reaktionsprodukt darstellen.



Bovine VSMCs, gefärbt mit Neufuchsin

5.2 Auswertung der Migration von VSMCs

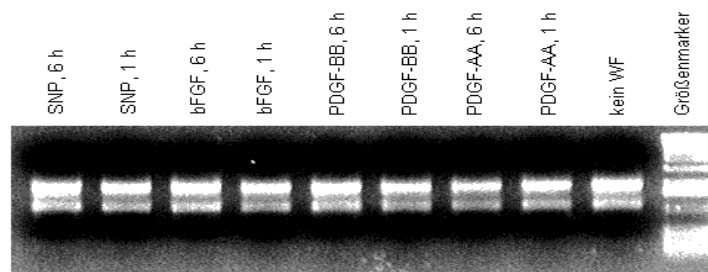
Die im folgenden Blockdiagramm graphisch dargestellte Migration der VSMCs nach Stimulation mit den von uns verwandten Wachstumsfaktoren, bzw. dem NO-Donator SNP, bestätigt die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der einzelnen Faktoren. PDGF-BB und bFGF führen hierbei zu einer deutlich vermehrten Migration. Nach Zusatz von NO ist jedoch die Migration der beiden vorherigen Wachstumsfaktoren erwartungsgemäß vermindert.



5.3 Qualitative und quantitative Beurteilung der RNA

Um die aus den VSMCs gewonnene RNA mengenmäßig möglichst genau einsetzen zu können, wurde zusätzlich zur Photometermessung die Qualität und Quantität mittels Agarosegelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht dargestellt und überprüft.

In der folgenden Abbildung des gefärbten Agarosegels, wurde jede Spur mit 0,5µl der gewonnenen RNA beladen. Da alle Banden gleich scharf und von annähernd gleicher Intensität sind, war die RNA für die anschließenden Versuche sowohl quantitativ als auch qualitativ sehr gut geeignet.



Bovine RNA – Ausgangsmaterial für die anschließenden
Versuche

5.4 RAP-PCR – Darstellung ausgewählter Polymorphismen

Um einen Ausschnitt der Genexpression unterschiedlich stimulierter vaskulärer boviner Muskelzellen darzustellen, wurden in dieser Arbeit 11 verschiedene arbiträre Primer-Kombinationen, mittels RNA-Fingerprinting, getestet. Berücksichtigt man, daß bei dieser Methode rund 50-100 Transkripte pro Primerkombination dargestellt werden (McClelland et al., 1994b), dann sind im Rahmen dieser Arbeit ungefähr 550-1100 Transkripte in der Polyacrylamidgelelektrophorese mit Silbernitratfärbung aufgezeigt worden. Unter diesen 1100 Transkripten finden sich 23 Banden, die als polymorph bezeichnet werden können, da die Expression dieser Banden im Vergleich zu der Kontrollspur, deutlich stärker bzw. schwächer wird.

	Primerkombination	Kloniert	Ergebnis blast - search	Laborbuch S.
1.	OPN 24 / HD 10			92.
2.		X	Human EST	92.
3.		X	p 97	92.
4.	OPN 27 / OPN 27	X	Human laminin B 2	89.
5.		X	/	89.
6.	OPN 24 / OPN 24	X	cDNA DUTT1	76.
7.		X	/	76.
8.		X	/	76.
9.				76.
10.		X	/	76.
11.	OPN 24 / Juc 1 A			116.
12.				116.
13.				116.
14.	OPN 21 / Juc 1 A			81.
15.	OPN 27 / OPN 25			90.

	Primerkombination	Kloniert	Ergebnis blast - search	Laborbuch S.
16.		X	/	90.
17.		X	Serin-Methyl-Transferase	90.
18.		X	/	90.
19.				90.
20.	OPS 04 / OPS 04			118.
21.				118.

Weitere getestete

Primerkombinationen :

OPN 21 / OPN 21

OPS 05 / OPN 27

OPS 04 / OPN 25

OPN 24 / OPN 27

In der weiteren vollständigen Darstellung, von der polymorphen Bande bis zur Auswertung der klonierten Sequenz, werden dann jedoch nur die Polymorphismen 3 und 4 berücksichtigt, an denen beispielhaft die Ergebnisse der unterschiedlichen Versuche aufgezeigt werden.

Bei dem ersten PAA-Gel fanden sich drei deutliche Polymorphismen:

Nr.	Kontrollspur	1 Std. stimuliert	6 Std. stimuliert	Beobachtet bei:	bp
1.	-	↑↑↑	↑↑↑	bFGF / SNP	630
2.	-	↓	↓	BB / bFGF / SNP	535
3.	-	↓	↓	BB / bFGF / SNP	325

bp = Basenpaare / Länge des Transkripts

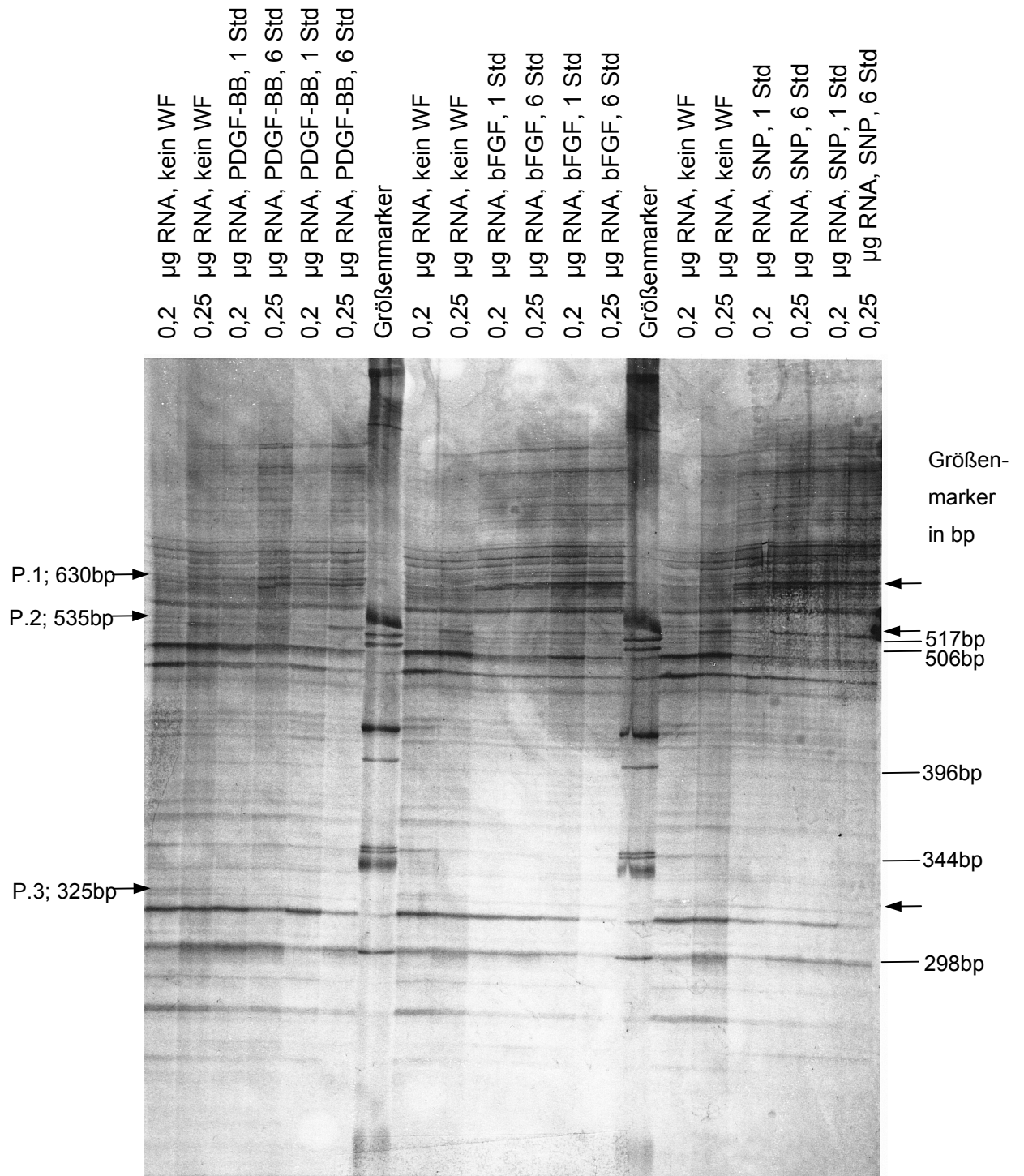
Kontrollspur = nicht stimulierte VSMCs

↑ = Expression im Vergleich zur Kontrollspur vermehrt

↓ = Expression im Vergleich zur Kontrollspur vermindert

Primerkombination: OPN 24 in der Erststrangsynthese

HD 10 in der Zweitstrangsynthese



In dem zweiten PAA-Gel fanden sich zwei deutliche Polymorphismen:

Nr.	Kontrollspur	1 Std. stimuliert	6 Std. stimuliert	Beobachtet bei:	bp
4.	-	↑↑	↑↑	BB / bFGF / SNP	500
5.	-	↓↓	↓↓	bFGF / SNP	415

bp = Basenpaare / Länge des Transkripts

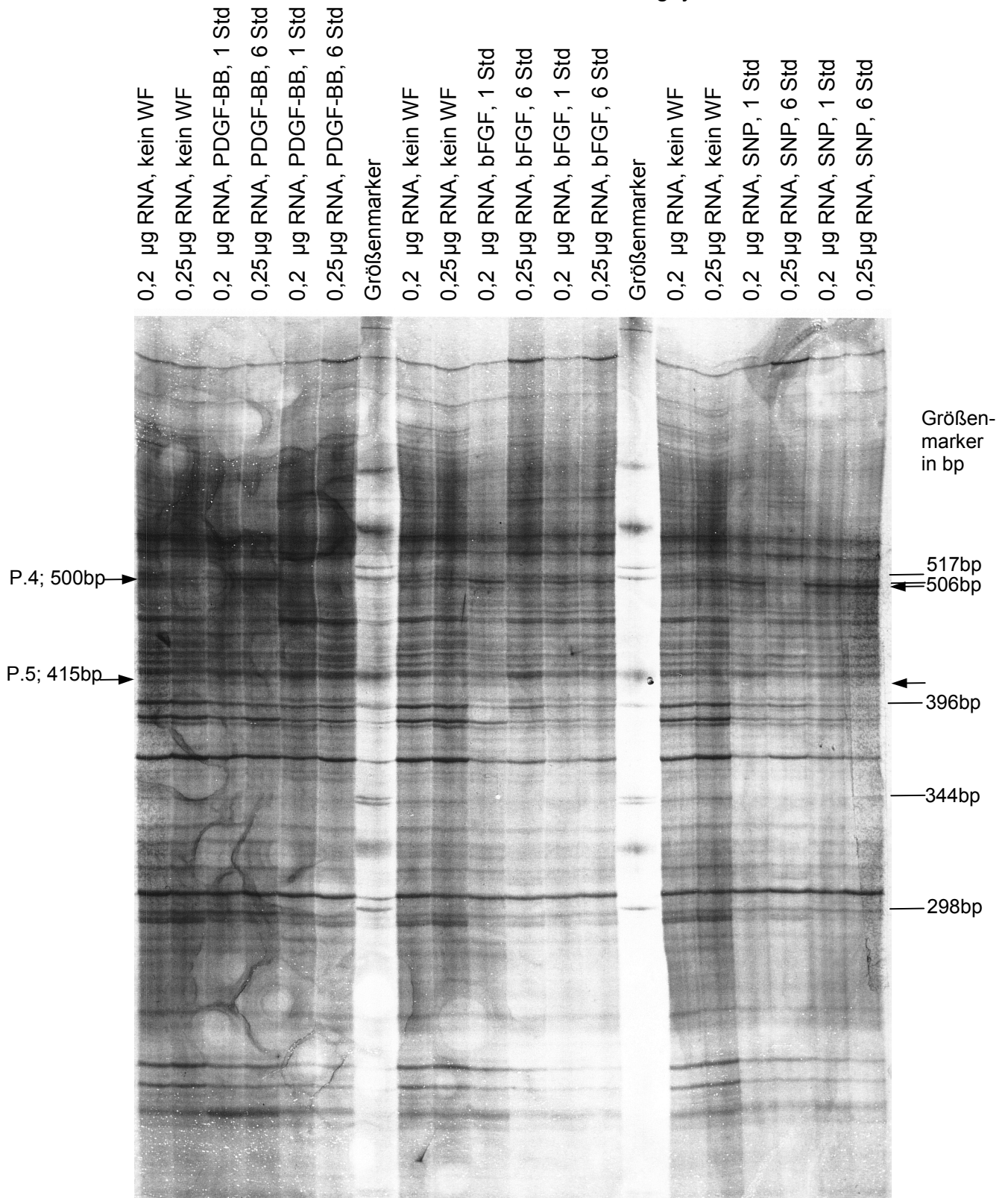
Kontrollspur = nicht stimulierte VSMCs

↑↑ = Expression im Vergleich zur Kontrollspur vermehrt

↓↓ = Expression im Vergleich zur Kontrollspur vermindert

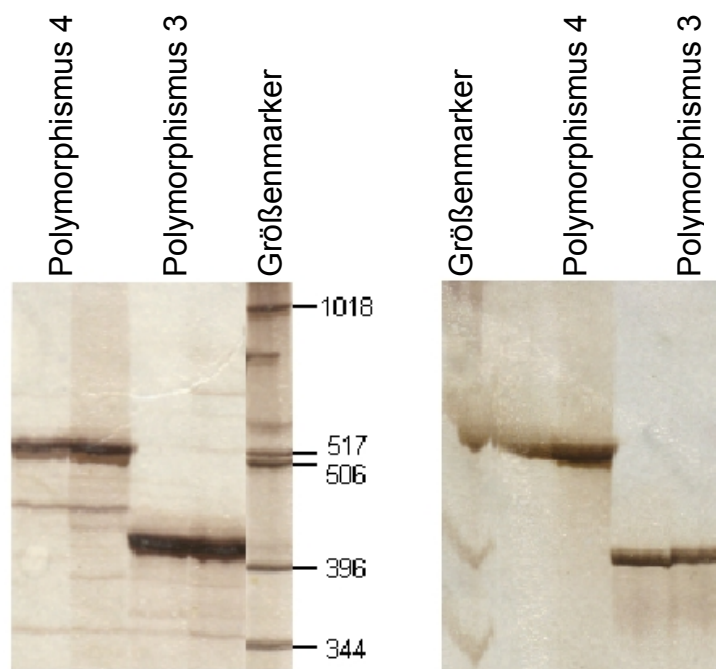
Primerkombination: OPN 27 in der Erststrangsynthese

OPN 27 in der Zweitstrangsynthese



5.5 Reamplifikationsprodukte

Um die DNA der oben gezeigten polymorphen Transkripte reamplifizieren zu können, wurden die entsprechenden Banden des auf Chromatographiepapier getrockneten PAA-Gels mit Hilfe einer sterilen Kanüle „abgekratzt“ (Stumm et al. 1997). Nach Durchlaufen der jeweiligen PCR-Reaktion wurden die Produkte erneut auf silbergefärbten PAA-Gelen dargestellt, um anhand des Größenmarkers zu überprüfen, ob die Anzahl der Basenpaare der reamplifizierte Bande auch der ursprünglich abgekratzten Bande entspricht. Weiterhin kann man hierbei die Reinheit der reamplifizierten Banden beurteilen.

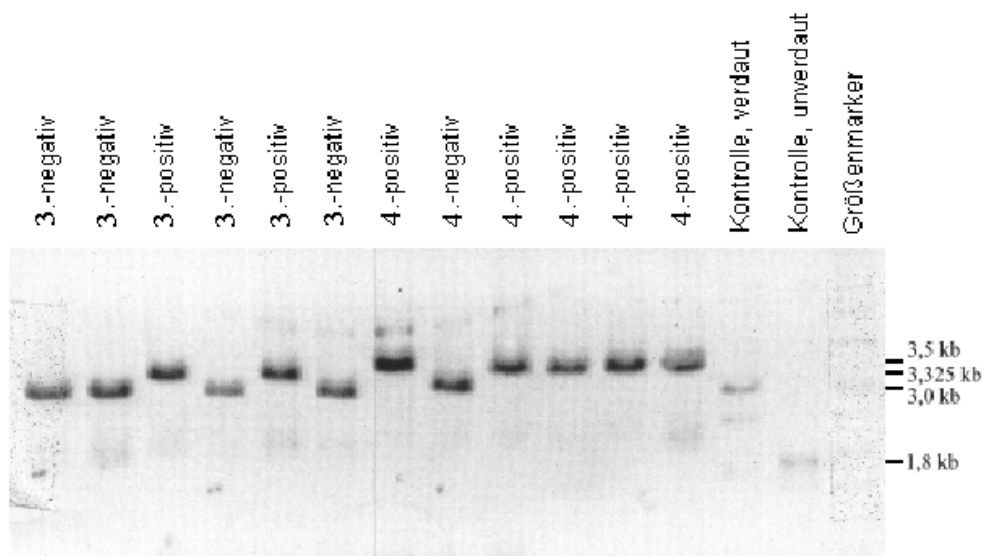


Das wiederholte Abkratzen der reamplifizierten DNA führt im rechten Gel zu einer deutlichen Reduzierung von „verunreinigenden“ Banden.

5.6 Klonierung und Sequenzierung

Nach der Reamplifikation und Ausfällung der polymorphen DNA, erfolgt die Klonierung in kompetenten *E. coli* des Bakterienstammes DH5 α . Die einzige Möglichkeit zur Kontrolle dieser verschiedenen Versuchsschritte ist die Agarosegelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau, bei dem die linearisierte DNA mittels einer positiven und einer negativen („verdaut/unverdaut“) Kontrolle ausgewertet wird.

Positiv sind die Proben, die das DNA-Insert enthalten, d.h. die Transkripte sind deutlich größer als die unverdaute Kontrolle, bzw. entsprechend der Anzahl der Basenpaare des klonierten Transkripts größer, als die verdaute Kontrolle.



5.7 Sequenzanalyse und deren spezifischer Nachweis in der PCR-Reaktion

Von den 21 polymorphen Transkripten wählten wir diejenigen aus, die eine besonders deutliche Veränderung durch Stimulation in den PAA-Gelen zeigten, so daß im weiteren insgesamt 11 Transkripte kloniert und sequenziert wurden. In zunächst vier Fällen zeigten die Sequenzen der Fragmente eine große Homologie zu bekannten humanen Gensequenzen:

- Laminin B2
- p97, ein kürzlich beschriebener Translationsregulator
- Serin-methyl-Transferase
- humane sequenzierte Expressionsetikette

Ein erneuter Abgleich der Sequenzen im April 1999 ergab in einem weiteren Falle eine hohe Homologie (93% Übereinstimmung).

- DUTT1, ein erst kürzlich isoliertes Protein, welches zur Familie der N-CAM Zell-Adhäsions-Proteine gehört. N-CAMs spielen eine wesentliche Rolle bei der Zell-Zell-Erkennung und deren Signalmechanismen (Esni et al., 1999; Sundaresan et al., 1998). Vor diesem Hintergrund wäre auch in diesem Falle ein weiterführender, spezifischer Nachweis sicherlich von Interesse gewesen.

Um die große Homologie unserer klonierten Sequenzen zu Laminin B2, bzw. p97 zu veranschaulichen, finden sich auf den folgenden zwei Seiten Auszüge aus der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Datenbank des National Center for Biotechnology Information, USA.

[emb/X13939/HSLAMIB2](#) Human mRNA fragment for laminin B2

Length = 1105

Score = 580 bits (291), Expect = e-163

Identities = 442/491 (90%), Gaps = 3/491 (0%)

Strand = Plus / Minus

Query: 1

```
gacgggggtgttgaagcagccgga-ggtaggggtcttcttgatgtcttccaggttgcaat 59
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
ggacgggggtgttgaagcagccagatggtaagggtcttcttgatgtcttccagattgcaat 914
Sbjct: 973
```

Query: 60

```
gtccttcaggatctcctcgatgtctcggttatagtccatgatggcagcctcctgcttcct 119
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
gtccttcagatctcctcgatatctcggttatagtccatgatggcagcctcctgcttcct 854
Sbjct: 913
```

Query: 120

```
ggcttcggttctccaggttggaacaccttctgtctagatcactgactttcacttcttctt 179
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
ggcttcattctccaggtcagacaccttcttatcaagatcgctgaccttcatttcattctt 794
Sbjct: 853
```

Query: 180

```
ggctttgttcaggggtgccttcaatctcatttagcttggttcaggtccactgtgtccagctg 239
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
ggctttgttttaggggtgccttcaatctcggttagcttattcaggtccactgtatccagctg 734
Sbjct: 793
```

Query: 240

```
cccaagctgctccaggaggtcattaataagggttgagaagggttggtaacagagtttttggc 299
||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
cccagctgctccaagaggtcattaataatgctgaggaggctagtaaacagagtttttggc 674
Sbjct: 733
```

Query: 300

```
ttttctggcattgatctcggttcttgagcttctgtgargccatccctgccatcatcat 359
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
ttttctggcattgatctcggttcttgagcagcctgtgaagccatccctgccatcatcat 614
Sbjct: 673
```

Query: 360

```
atcctgggtcagcatcttcttgttttttcttcagctctttttctgcttcctgtagttgttt 419
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
gtcctgggtcagcgtcatcttgttttctctttagctctttttctgcttcctgcagttgctt 554
Sbjct: 613
```

Query: 420

```
caacatattattcacctcggttatccagatctgt-acttctgc-aaagtcctttcagcttc 477
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||
caacatattgttcacctcattatccagatctgtaacttctgcaaaagttctttcagcttc 494
Sbjct: 553
```

Query: 478

```
drcctgggtgc 488
|| |||||||
tgccttggtgc 483; Sbjct: 493
```

[gb|U73824|HSU73824](#) Human p97 mRNA, complete cds
 gi|4503538|ref|NM_001418.1|EIF4G2| Homo sapiens eukaryotic
 translation initiation factor 4 gamma, 2 (EIF4G2) mRNA
 Length = 3820
 Score = 468 bits (236), Expect = e-130
 Identities = 281/296 (94%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 1
 ccgtcaaaggaagaactgcttaaactaactgaaactggtgtaactgaatacctgaatagt 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 ccgtcaaaggaagaactccttaaactaactgaaactggtgtgactgaatatctaaatagt 1980
 Sbjct: 1921

Query: 61
 gggaaatgcaaataagctgtcaatggtgtgagagagatgagagctcctaaacacttcctt 120
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 ggaaatgcaaataaggctgtcaatggtgtaagagaaatgagggctcctaaacactttcctt 2040
 Sbjct: 1981

Query: 121
 cctgagatgttaagcaaagtaatcatcctgtcactggatagaagtgatgaagataaagaa 180
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 cctgagatgttaagcaaagtaatcatcctgtcactagatagaagcgatgaagataaagaa 2100
 Sbjct: 2041

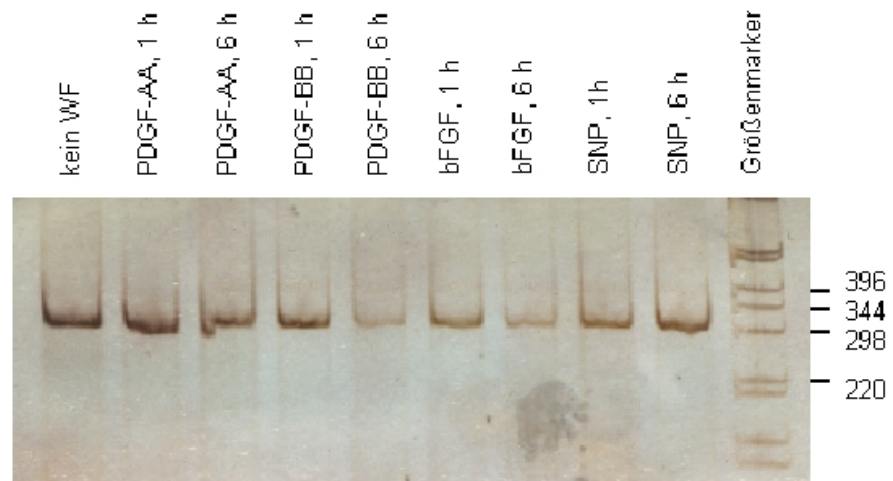
Query: 181
 aaagcgagttctttgatcagtttactcaaacaggaagggatagccacaagtgacaacttc 240
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 aaagcaagttctttgatcagtttactcaaacaggaagggatagccacaagtgacaacttc 2160
 Sbjct: 2101

Query: 241
 atgcaggctttcctgaatgtattggaccggtgccccaaactggaggttgacatccc 296
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 atgcaggctttcctgaatgtattggaccagtgtcccaaactggaggttgacatccc 2216
 Sbjct: 2161

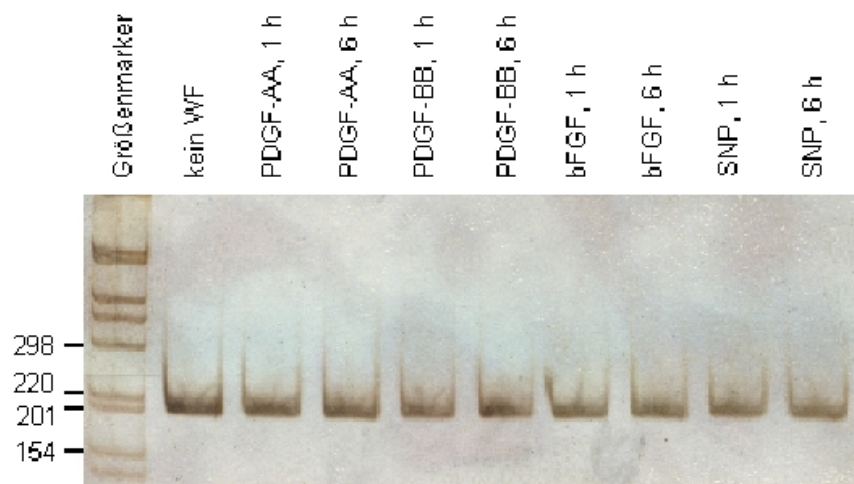
Ein spezifischer Nachweis wurde für Laminin B2 und das Protein p97 und noch zwei weitere Fragmente mittels Reverser-Transkriptions-PCR, RT-PCR, durchgeführt. Als quantitative Kontrolle wurde hierbei das „housekeeping gene“ β -actin verwandt (Raff et al., 1997).

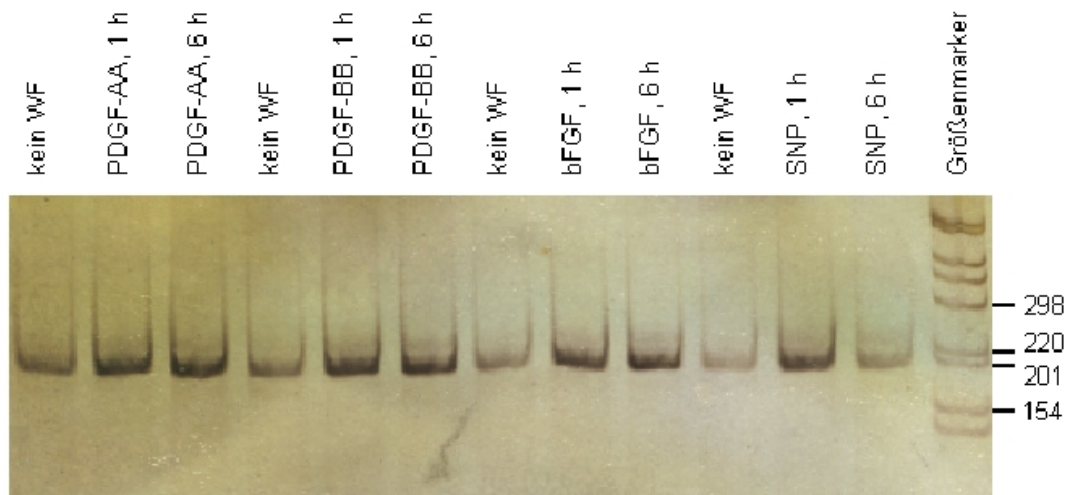
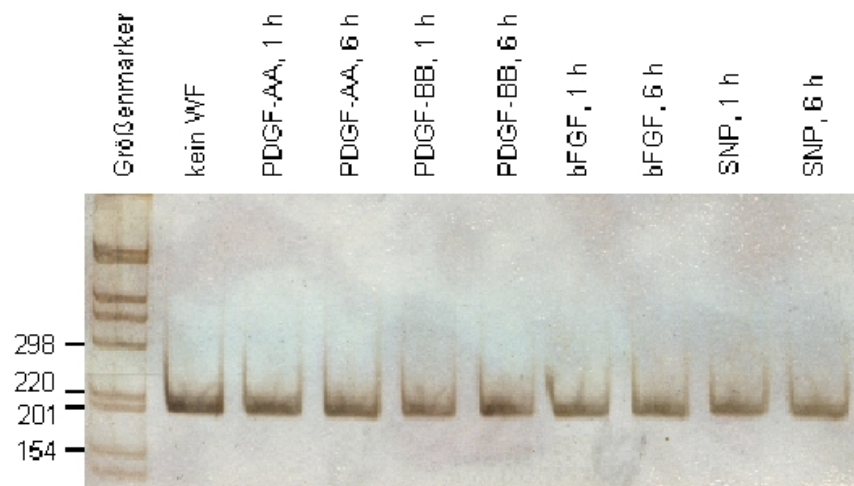
Von den Produkten der RT-PCR wurden nicht-denaturierende Polyacrylamidgele mit anschließender Silberfärbung angefertigt.

p97



β -actin



Laminin B2 **β -actin**

6 DISKUSSION

Bei der Restenose handelt es sich auch heute noch um das zentrale Problem aller gefäßeröffnenden Maßnahmen. Obwohl weltweit intensiv an der Vermeidung dieser Langzeitkomplikation geforscht wird, ist es bisher nicht gelungen, die Restenosebildung deutlich zu verringern. Im Vordergrund der Forschung stand dabei lange Zeit die systemische pharmakologische Therapie (Herrman et al., 1993) aber auch die Durchführung der Ballondilatation ist bezüglich ihres Einflusses auf die Rezidivstenose eingehend untersucht worden. Dazu wurden unterschiedliche Parameter, wie Dauer der Inflation, Höhe des Drucks, Länge des Ballons, Über- oder Unterdimensionierung der Ballongröße in Bezug zum Gefäßlumen, untersucht. Im Bereich der Koronararterien konnte hier zumindest eine Verminderung der angiographischen Restenoserate auf 19% nach PTCA mit intravaskulärem Ultraschall-adaptierter Wahl der Ballongröße erzielt werden (Schroeder et al., 1999). Unter Veränderung der anderen genannten Parameter zeigte sich jedoch keine eindeutige Beeinflussung der Rezidivrate (Höfling et al., 1997).

Da durch klinische Beobachtungen und histologische Befunde allein scheinbar kein Erfolg in der Prävention der Restenose nach PTA erzielt werden kann, bieten hier molekularbiologischen Untersuchungen ein neues Spektrum, um die Pathophysiologie der Rezidivstenose noch besser aufzuschlüsseln. Blutgefäße sind grundsätzlich in der Lage, ihr Umgebungsmilieu genau zu analysieren und die erfaßten humoralen und biomechanischen Informationen sofort zu verarbeiten und sich entsprechend anzupassen, wie z.B. das Vascular Remodeling zeigt (Topper, 2000). Als langfristiges Ziel sollte die Gen-Therapie der Restenose verfolgt werden. Allerdings sind selbst nach Aufschlüsselung der komplexen Vorgänge auf molekularbiologischer Ebene noch Probleme, wie beispielsweise die technische Durchführbarkeit, Gene in die Arterienwand zu transportieren, zu lösen (DeYoung et al., 1998).

6.1 RAP-PCR als Methode

Biologische Prozesse, wie die Embryogenese, Zelldifferenzierung und - wie im vorliegenden Falle - die zelluläre Antwort auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren - gehen einher mit Veränderungen der Genexpression (Jorgensen, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die RAP-PCR als Methode zur Analyse der differentiellen Genexpression von VSMCs in vitro sehr gut geeignet ist (Alfke et al., 1999).

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Methoden zur Unterscheidung von mRNA in vergleichenden Untersuchungen, darunter die subtraktive Hybridisierung oder differentielle Hybridisierung, entwickelt. Diese beiden methodisch schwierigen Verfahren bedienen sich nicht der PCR, eignen sich jedoch zur Darstellung von reichlich exprimierten Genen (Sambrook et al., 1989). Die repräsentative Differenzanalyse (RDA) oder auch die EST-Klonierung (exprimierte sequenzmarkierte Stelle) dagegen nutzen zwar die PCR, sind aber technisch sehr aufwendig und arbeitsintensiv (Hubank et al., 1994; Zhang et al., 1997).

Betrachtet man alle genannten Methoden, so zeichnet sich die RAP-PCR durch die einfache Handhabung, die hohe Sensitivität, die vergleichsweise geringen Kosten sowie die Möglichkeit viele unterschiedliche Proben parallel zu untersuchen und dabei vielleicht auch neue Gene zu entdecken, aus (Mathieu-Daudé et al., 1999). Bei der Verwendung kurzer arbiträrer Primer in der RAP-PCR lassen sich rund 50-100 Transkripte pro Spur im Polyacrylamid-Übersichtsgel darstellen (McClelland et al., 1994b). Gleichzeitig erhält man dabei Informationen über die Hoch- oder Runterregulation von Genen, da sich die Intensität der einzelnen Banden im allgemeinen proportional zur Konzentration der entsprechenden Sequenz verhält (McClelland et al., 1994a). Die Kombination der RAP-PCR mit der im Anschluß durchgeführten quantitativen Bestätigungs-RT-PCR mit speziell für diesen Schritt angefertigten Primern, läßt auch bei

sehr ähnlichen Ausgangszellen sicher zwischen allgemein hochregulierten und spezifisch unterschiedlich regulierten Genen eine Unterscheidung zu (Müller-Ladner et al., 1999).

Für die Darstellung der PCR-Produkte wurden in der vorliegenden Arbeit Polyacrylamid-Gele mit anschließender Silbernitratfärbung, anstelle der sonst weit verbreiteten radioaktiven Techniken genutzt. Die Vorteile der Färbung mit Silbernitrat sind die einfache, ungefährliche und kostengünstige Handhabung, nachteilig ist dagegen die etwas geringere Sensitivität dieser Methode im Vergleich zur radioaktiven Markierung (Schlegel et al., 1996).

6.2 Protein p97

Bei dem von uns klonierten und anschließend sequenzierten Polymorphismus Nr. 3 konnten wir anhand der internationalen Datenbank eine 94%ige Übereinstimmung mit der mRNA des Humanen p97 nachweisen. Hierbei handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 97 kDa, welches erstmals 1997 von der Arbeitsgruppe Imataka (Imataka et al., 1997) als Translationsinhibitor in der Literatur erwähnt wurde.

Die Arbeitsgruppe beschreibt p97 als einen Faktor, der die Translation der mRNA an den Ribosomen beeinflusst. p97 ist weitestgehend homolog zu den C-terminalen zwei Dritteln des bereits bekannten Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G (eIF4G) (Gradi et al., 1998; Yamanaka et al., 1997, Pyronnet et al., 1999). Diese C-terminale Region des eIF4G verfügt über Bindungsstellen für zwei weitere Faktoren, eIF4A und eIF3 (Lamphear et al., 1995). eIF4A wird am C-terminalen Drittel gebunden und ist absolut notwendig für das Funktionieren der Cap-abhängigen und Cap-unabhängigen Translation (Pause et al., 1994), während der Faktor eIF3, welcher im mittleren Drittel von eIF4G lokalisiert ist, essentiell für die Bereitstellung der Ribosomen zur anschließenden Translation der mRNA ist (Pain, 1996).

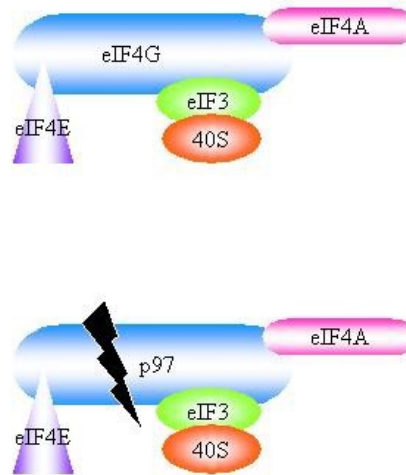


Abb. nach Hentze, 1997.

P97 bindet – wie die Homologie zu den C-terminalen zwei Dritteln des eIF4G bereits erwarten ließ - ebenfalls die Faktoren eIF4A und eIF3. Hierbei hat sich jedoch gezeigt, daß p97, ganz im Gegensatz zu seinem homologen Faktor eIF4G, sowohl die Cap-abhängige, als auch die Cap-unabhängige Translation hemmt (Hentze, 1997). Diese Hemmung der Translation kommt dadurch zustande, daß p97 zusammen mit eIF4A und eIF3 einen Proteinkomplex bildet, der die Initiationsfunktion dieser beiden notwendigen Faktoren inaktiviert, wodurch es zu einer Reduzierung der Proteinsynthese von bis zu 25% kommen kann (Imataka et al., 1997).

Seit einigen Jahren ist weiterhin bekannt, daß Faktoren, die die Proteinsynthese hemmen, sich ebenfalls auf die Apoptose, also den programmierten Zelltod, auswirken (Martin et al., 1988, Polunovsky et al., 1994). In diesem Zusammenhang gelang es Levy-Strumpf et al. (1997), p97 als mutmaßlichen Modulator des Interferon- γ gesteuerten programmierten Zelltodes, zu klonieren. Die zelluläre Struktur eines

gesunden Gefäßes wird durch das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelluntergang durch Apoptose bestimmt (Gibbons et al., 1994), wobei das Zusammenwirken der unterschiedlichen autokrinen und parakrinen Faktoren, die dieses Gleichgewicht steuern, noch nicht ausreichend verstanden ist (Best et al., 1999; Pollmann et al., 1996). Es ist jedoch bekannt, daß die Traumatisierung der Arterienwand durch die PTA zu hyperplastischem Zellwachstum mit Anstieg der Gesamtzellzahl führt (Muller, 1997). Somit muß eine Störung der physiologischen Apoptose als ein weiterer wichtiger Faktor der Restenoseentstehung nach PTA betrachtet werden.

Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt, wurde bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit die Bande des p97, außer bei der einstündigen Zellstimulation mit PDGF-BB, im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollzellen, in allen Fällen herabreguliert. Berücksichtigt man nun die bisher bekannten Entstehungsmechanismen der Restenose nach PTA, dann legt dieses Ergebnis nahe, daß es sich bei p97 durchaus um einen physiologischen Faktor handelt, der sich hemmend, aber auch kontrollierend auf die Proteintranslation auswirkt. Weiterhin läßt sich auch die überschießende zelluläre Reaktion nach dem Barotrauma der PTA besser nachvollziehen, wenn man berücksichtigt, daß die verminderte Expression des Apoptose-induzierenden Faktors p97 das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelluntergang beeinflusst. Unsere Beobachtungen diesbezüglich stimmen mit denen der Forschungsgruppe Bauriedel et al. überein. In 1996 gelang es dieser Gruppe anhand von humanen Atherektomieproben aus Primär- und Restenoseläsionen aufzuzeigen, daß insbesondere die zellreichen Restenosen eine signifikant verminderte Apoptoserate aufwiesen (Bauriedel et al., 1996; Isner et al., 1995). Weitere Forschungsergebnisse der Gruppe Bauriedel et al. aus 1997 legen nahe, daß der Verminderung von Apoptoseprozessen eine wichtige Rolle bei der Formierung von Restenoseläsionen, neben Migration und Proliferation, zukommt (Bauriedel et al., 1997).

6.3 Extrazellulärmatrix und Laminin B2

Die Restenose nach PTA ist ein multifaktorielles Geschehen, welches als Reaktion auf das Barotrauma der Arterienwand, ausgelöst wird. Viele Studien haben sich in der Vergangenheit ausgiebig mit den möglichen Ursachen der Migration und Proliferation der VSMCs beschäftigt, wobei in den meisten Fällen auch die vermehrte Produktion von Extrazellulärmatrix erwähnt wurde (Thyberg et al., 1997; Bauriedel et al., 1994; Calara et al., 1996). Die Extrazellulärmatrix besteht aus einem komplexen Netzwerk verschiedener Makromoleküle, die eine physiologische Verbindung zwischen den konstitutiven Zellen herstellen (Ju et al., 1996). In den meisten Organen werden die Makromoleküle der EMC von Fibroblasten sezerniert (Lin et al., 1993), im vaskulären System sind jedoch die VSMCs ebenfalls in der Lage, EMC zu produzieren (Ju et al., 1996). Die vaskuläre Extrazellulärmatrix besteht größtenteils aus verschiedenen Kollagen-Subtypen, Laminin, Fibronectin, Elastin und unterschiedlichen Proteoglykanen. (Faxon et al., 1997).

Das typische histologische Bild der Intimahyperplasie besteht aus einer losen Ansammlung glatter Muskelzellen und Makrophagen, umgeben von Extrazellulärmatrix (Austin et al., 1985). Versuche mit Kaninchenarterien haben gezeigt, daß die Synthese von Kollagen, Elastin und Proteoglykanen und Glykoproteinen um das vier- bis zehnfache, über einen Zeitraum von 4 Wochen nach Trauma, ansteigt (Strauss et al., 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es sich bei einer der von uns klonierten und sequenzierten Banden mit 90%iger Übereinstimmung in der internationalen Datenbank um das humane Laminin B2 handelt, worauf im folgenden weiter eingegangen wird.

Laminin ist ein Glykoprotein, welches sich aus drei Untereinheiten, der A-Kette (400 kDa) und zwei B-Ketten (B1 und B2, jeweils 200 kDa),

zusammensetzt (Kreis et al., 1993). Als Bestandteil der vaskulären Basalmembran (Chiang et al., 1991) zählt Laminin zu den Faktoren der Extrazellulärmatrix, die die Zelladhäsion und -migration, sowie Zellwachstum und -differenzierung vermitteln, womit ihm eine entscheidende Funktion in gesunden Organen zukommt (Lundgren et al., 1988). Die erhöhte Expression von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix spielt jedoch auch eine bisher nicht vollständig verstandene Rolle bei der Entstehung der vaskulären Hypertrophie, sowie der Restenose nach PTA (Ju et al., 1996). Laminin trägt weiterhin zur phänotypischen Differenzierung, insbesondere der Aufrechterhaltung des kontraktiven Phänotyps der VSMCs, bei (Hedin et al., 1988). Die Modulation des Phänotyps der VSMCs ist für die Proliferation der Zellen als Antwort auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren in vivo und in vitro erforderlich (Chamley-Campbell et al., 1981).

Betrachtet man das gefärbte und fixierte Polyacrylamidgel und den anschließend durchgeführten spezifischen Nachweis für Laminin B2, dann zeigt sich, daß die Intensität der Bande, insbesondere bei einstündiger Stimulation mit PDGF-BB und sechsständiger Stimulation mit SNP, im Vergleich zur Kontrollspur, zunimmt. Eine Funktion des Laminin B2 besteht darin, wie bereits oben erwähnt, den Phänotyp der kontraktiven glatten Muskelzelle aufrecht zu erhalten. Somit stellt sich nun durchaus die Frage, ob eine vermehrte Expression von Laminin B2 als Stabilisationsversuch der glatten Muskelzelle gewertet werden kann. Denn wenn es möglich wäre, über eine erhöhte Produktion von Laminin B2 eine Umwandlung des kontraktiven Typs der VSMC in den sezernierenden Phänotyp zu verhindern, wäre einer der Mechanismen der Restenoseentstehung möglicherweise erfolgreich blockiert.

6.4 Limitationen der vorliegenden Arbeit

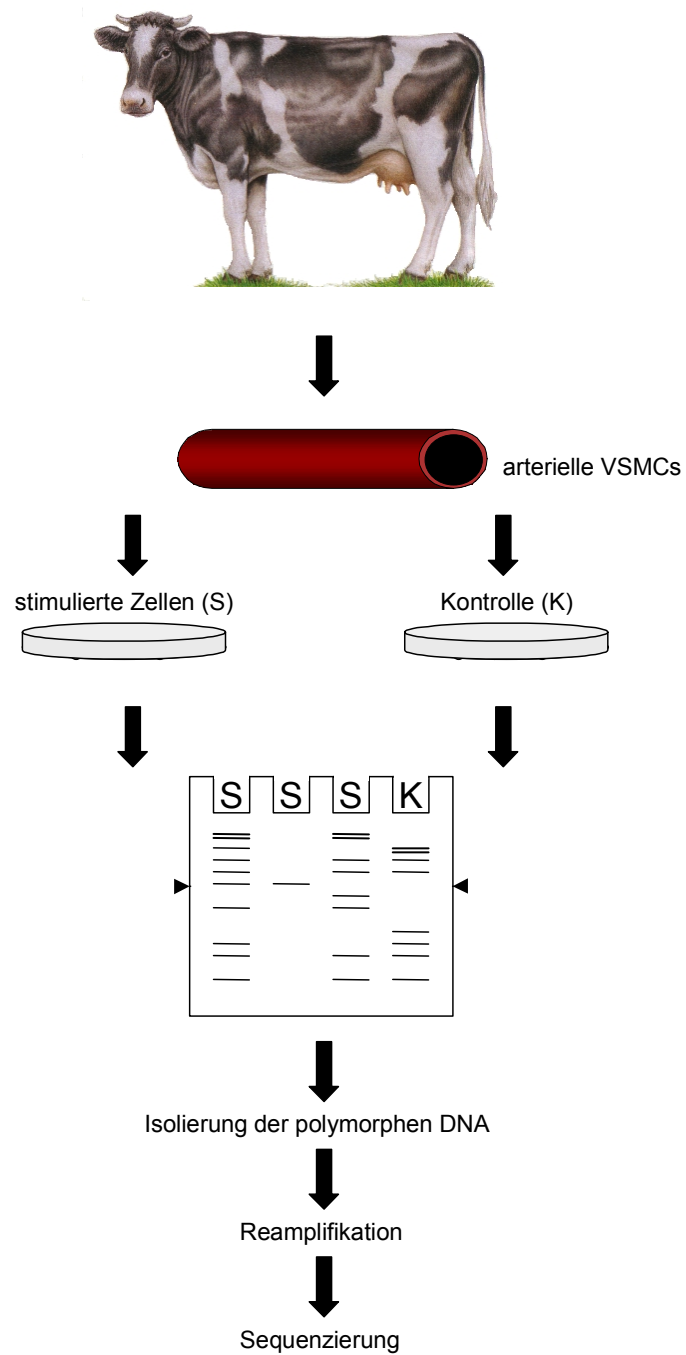
Im Rahmen dieser Arbeit haben wir nicht mit humaner, sondern mit boviner RNA gearbeitet, die wir aus glatten Muskelzellen der Aorta des Rindes gewonnen haben. Da es sich bei den Rindern um „normales Schlachtvieh“ handelte, müssen wir davon ausgehen, daß die Zellstruktur nicht der einer atherosklerotischen Aorta entspricht; zumindest konnte makroskopisch kein Anhalt dafür gefunden werden. In der Literatur findet man viele Studien, in denen vergleichbar vorgegangen wurde. Noch häufiger als bovine wurden jedoch glatte Muskelzellen aus der Aorta der Ratte verwandt, bei denen ebenfalls keine Vorschäden der Arterienwand bekannt waren und die ebenfalls nicht vorab mit einer speziellen Diät ernährt wurden (Bilato et al., 1995; Dubey et al., 1995).

Vorteil der bovinen VSMCs ist nicht nur die nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit, sondern auch die Tatsache, daß keine speziellen Versuchstiere notwendig sind. Zudem handelt es sich um eine kostengünstige Variante der Zellkultur, da das benötigte Medium und Serum in wesentlich größeren Mengen zur Verfügung steht und damit natürlich auch preiswerter ist. Vor dem Hintergrund, daß wir eine Methode etablieren wollten, von der vorab nicht offensichtlich bekannt war, daß sie uns verwertbare Ergebnisse auch im Hinblick auf unsere Fragestellung der Restenose nach PTA liefern würde, hielten wir die Wahl der bovinen Zellen für gerechtfertigt. Sicherlich bietet es sich nun an, nach erfolgreicher Etablierung der Methode, vergleichbare Versuche an humanen VSMCs durchzuführen. Grundsätzlich wäre es dabei natürlich von Vorteil, wenn Restenosematerial zur Verfügung stünde.

Wie bereits erwähnt, wurden die Polyacrylamid Gele in unserem Labor selber angesetzt und gegossen. Aufgrund unterschiedlicher Faktoren wie Lagerungszeit der Einzelkomponenten, unter Umständen schwankende Konzentrationen in der Zusammensetzung der Einzelkomponenten, wie auch die Polymerisationsdauer des einzelnen Gels wurden

Schwankungen in der Qualität der großen Übersichtsgele beobachtet. Dadurch wurde insbesondere die Auswertung des Wachstumsfaktors PDGF-AA erschwert, da die entsprechenden Proben grundsätzlich getrennt von den restlichen, auf einem separaten Gel liefen. Daher läßt sich in einigen Fällen in der Übersicht nicht eindeutig auswerten, wie sich die ansonsten polymorphen Banden unter Einfluß von PDGF-AA verhalten.

7 ZUSAMMENFASSUNG



Bei der perkutanen transluminalen Angioplastie handelt es sich abhängig von der Lokalisation einer Gefäßstenose, in vielen Fällen um die Therapie der Wahl bei vaskulären Verschußprozessen. Die primäre Erfolgsrate dieser Behandlungsmethode ist sehr hoch und in den seltensten Fällen mit Komplikationen verbunden. Ein Problem bleibt jedoch trotz intensiver Forschungsarbeit die Rezidivrate, die je nach Lage und Ausdehnung der Primärstenose bis zu 60% betragen kann.

Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Entstehung restenotischer Läsionen. Ziel dieser Arbeit war es, die differentielle Genexpression von VSMCs nach Stimulation mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren, die im Rahmen der PTA freigesetzt werden, zu untersuchen. Hierzu wurde bovine RNA von stimulierten Zellen und Kontrollzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Für die Stimulation verwendeten wir Wachstumsfaktoren (PDGF-AA, PDGF-BB, bFGF) und den NO-Donator Natriumnitroprussid (SNP). Die Genexpression der Zellen wurde durch RAP-PCR-Fingerprints (RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction) und anschließender silbergefärbter Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Polymorphe Fragmente wurden sequenziert und weiter analysiert.

Mit der RAP-PCR ließen sich unterschiedliche Bandenmuster zwischen stimulierten- und Kontrollzellen darstellen. Die Sequenzen von fünf Fragmenten zeigten eine hohe Homologie zu bekannten humanen Gensequenzen (Serin-Methyl-Transferase, DUTT1, Laminin B2, ein Translationsregulator (p97) sowie eine humane, sequenzierte Expressionskette (EST-expressed sequence tag)). Der spezifische Nachweis der vermehrten Laminin B2 und verminderten p97 Expression wurde mittels reverser Transkriptions PCR (RT-PCR) durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die RAP-PCR als Methode zur Analyse der differentiellen Genexpression unterschiedlich stimulierter VSMC in vitro etabliert werden. Die Gene für Laminin B2 und p97 werden nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren in bovinen VSMCs differentiell

exprimiert.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Alfke H, Böger RH, Bode-Böger SM. Restenose nach perkutaner transluminaler Angioplastie: I. Ätiologie und klinische Bedeutung. VASA 1996; Band 25, Heft 1:13-20.

Alfke H, Kleb B, Klose KJ. Nitric oxide inhibits the basic fibroblast growth factor-stimulated migration of bovine vascular smooth muscle cells in vitro. VASA 2000; 29:99-102.

Alfke H, Stumm G, Schnieder I, Klose KJ, Schlegel J. Differential gene expression of vascular smooth muscle cells. Detection by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. VASA 1999; 28:164-168.

Austin GE, Raffitt MB, Hollman J. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. J Am Coll Cardiol 1985;6:369-375.

Bauriedel G, Heidemann P, Heimerl J, Kandolf R, Höfling B. Detection of PDGF mRNA in human restenotic plaque tissue by in situ hybridization: implication for novel therapeutic approaches. J Am Coll Cardiol 1994; 23: 124A.

Bauriedel G, Höfling B, Grünwaldt C, Beinert T, Welsch U. Zellularität und ultrastrukturelle Charakteristika humaner Atherektomiezyylinder: Vergleich zwischen Restenose- und Primärstenosegewebe koronarer und peripherer Läsionen. Z Kardiol 1993; 82:485-493.

Bauriedel G, Hutter R, Schluckebier S, Welsch U, Prescott MF, Kandolf R, Lüderitz B. Verminderte Apoptose als Pathogenesefaktor der intimalen Hyperplasie humaner Arterioskleroseläsionen. *Z Kardiol* 1997; 86:572-580.

Bauriedel G, Schluckebier S, Welsch U, Klingel K, Kandolf R, Steinbeck G. Inzidenz und Lokalisation von Apoptosekörpern in humanen Arterioskleroseläsionen. *Z Kardiol* 1996; 85. 509-518.

Bauters C, Banos JL, vBelle E, McFadden EP, Lablanche JM, Bertrand ME. Six-Months Angiographic Outcome after successful Repeat Percutaneous Intervention for In-Stent Restenosis. *Circulation* 1998;97:318-321.

Best P, Hasdai D, Sangiorgi G, Schwartz RS, Holmes DR, Simari RD, Lerman A. Apoptosis - Basic Concepts and Implications in Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:14-22.

Bilato C, Pauly R, Melillo G, Monticone R, Gorelick-Feldman D, Gluzband Y, Sollott SJ, Ziman B, Lakatta EG, Crow MT. Intracellular Signaling Pathways Required for Rat Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *J Clin Invest* 1995; 96:1905-1915.

Bilder G, Wentz T, Leadley R, AminD, Byan L, O'Conner B, Needle S, Galczenski H, Bostwick J, Kasiewski C, Myers M et al.. Restenosis Following Angioplasty in the Swine Coronary Artery Is Inhibited By an Orally Active PDGF-Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, RPR 101511A. *Circulation* 1999; 99:3292-3299.

Block PC, Myler RK, Stertzer S, Fallon J. Morphology after transluminal angioplasty in human beings. *N Engl J Med* 1981; 305:382-385.

Böger RH, Bode-Böger SM, Alfke H. Restenose nach perkutaner transluminaler Angioplastie: II. Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention. VASA 1996; 1:21-31.

Brothers TE, Robison JG, Elliott BM, Boggs JM, Frankel AE, Willingham MC. Upregulation of bFGF Receptor Expression after Carotid Bypass. J Surg Res 1995;58:28-32.

Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. AM J Hum Genet 1991; 48:137-144.

Calara F, Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Kupfer J, Hedin U, Forrester J, Prediman KS, Nilsson J. Autocrine Induction of DNA Synthesis by Mechanical Injury of Cultured Smooth Muscle Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16:187-193.

Carr A, Frei B. The Role of Natural Antioxidants in Preserving the Biological Activity of Endothelium-Derived Nitric Oxide. Free Radic Biol Med 2000; 28:1806-1814.

Casterella PJ, Teirstein PS. Prevention of coronary restenosis. Cardiol Rev 1999; 7:219-231.

Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle cells to serum mitogens. J Cell Biol 1981; 89:379-383.

Clark TWI, Groffsky JL, Soulen MC. Predictors of long-term patency after femoropopliteal angioplasty: results from the STAR registry. J Vasc Interv Radiol 2001; 12:923-933.

Chiang YY, Takebayashi S, Oberley TD. In vitro analysis of extracellular matrix production by porcine glomerular mesangial and vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1991; 138:1349-1358.

Dartsch P. Möglichkeiten und Grenzen von Zellkulturen der Gefäßwand zur Erforschung der Atherosklerose. *Med Welt* 1992; 43:718-726.

DeYoung MB, Dichek DA. Gene Therapy for Restenosis - Are We Ready? *Circ Res* 1998; 82:306-313.

Dionne CA, Crumley G, Bellot F, et al. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J* 1990; 9:2685-2692.

Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction. *Circulation* 1964; 30:654-670.

Drechsel S, Bertel O, Lafont A. Mechanismen und Prävention der Restenose nach Koronarangioplastie. *Schweiz Med Wochenschr* 1998;128:497-507.

Dubey R, Jackson E, Lüscher T. Nitric Oxide Inhibits Angiotensin II-induced Migration of Rat Aortic Smooth Muscle Cell. *J Clin Invest* 1995; 96:141-149.

Esni F, Taljedal IB, Perl AK, Cremer H, Christofori G, Semb H. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* 1999; 144:325-337.

Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999; 99:44-52.

Faxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the Coronary Artery after Vascular Injury. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 40:129-140.

Ferns G, Stewart-Lee A, Änggård E. Arterial response to mechanical injury: balloon catheter de-endothelialization. *Atherosclerosis* 1992;89-104.

Flugelman MY, Virmani R, Correa R, Yu ZX, Farb A, Leon MB, Elami A, Fu YM, Casscells W, Epstein SE. Smooth muscle cell abundance and fibroblast growth factor in coronary lesions of patients with nonfatal unstable angina. *Circulation* 1993; 88:2493-2500.

Furchgott RF. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA* 1996; 276:1186-1188.

Forsyth EA, Aly HM, Neville RF, Sidawy AN. Proliferation and extracellular matrix production by human infrageniculate smooth muscle cells in response to interleukin-1 β . *J Vasc Surg* 1997; 26:1002-8.

Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; 330:1431-1438.

Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 1992; 6:3362-3369.

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316:1371-1407.

Gospodarowicz D, Ferrara N, Haaparanta T, Neufeld G. Basic fibroblast growth factor: expression in cultured bovine vascular smooth muscle cells. Eur J Cell Biol 1988; 46:144-151.

Gradi A, Imataka H, Svitkin J, Rom E, Raught B, Morino S, Sonenberg N. A Novel Functional Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. Mol Cell Biol 1998; 1:334-342.

Grüntzig A, Hopff G. Perkutane Rekanalisation chronischer arterieller Verschlüsse mit einem neuen Dilatationskatheter. Dtsch Med Wochenschr 1974; 99:2502-2505.

Guzman L, Mick M, Arnold A, Forudi F, Whitlow P. Role of Intimal Hyperplasia and Arterial Remodeling after Balloon Angioplasty. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; Vol 16, No 3:479-487.

Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. J Cell Biol 1988; 107:307-319.

Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. EMBO J 1992; 11:4251-4259.

Hentze WM. eIF4G: A Multipurpose Ribosome Adapter? Science 1997;275:500-501

Herrman JPR, Hermans WR, Vos J, Serruys PW. Pharmacological approaches to the prevention of restenosis following angioplasty. The search for the Holy Grail? Drugs 1993; 46:18-52.

Höfling B, Gonschior P, Esin S, Nikol S. Das Problem der Restenose nach Angioplastie – klinische Bedeutung, Pathobiologie, zukünftige Entwicklung zur Suppression der Rezidivstenose. Internist 1997; 38:31-43.

Höfling B, Gonschior P, Nikol S, Bauriedel G, Welsch U, Nerlich A. Pathophysiologie und Pathobiochemie der Rezidivstenose. Z Kardiol 1994; 83:313-318.

Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Höher M. Rezidivstenose nach Koronarangioplastie. Z Kardiol 1995; 84:5-21.

Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Res 1994; 22:5640-5648.

Hughes E, Crossman D, Hall P. Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries. Cardiovasc Res 1993; 27:1214-1219.

Imataka H, Olsen H, Sonenberg N. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. EMBO J 1997; 16:817-825.

Isner JM. Vascular Remodeling. Circulation 1994; 89, 6:2937-2941.

Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in Human Atherosclerosis and Restenosis. Circulation 1995; 91:2703-2711.

Jawin A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1992; 89:507-511.

Jorgensen M, Bevort M, Kledal TS, Hansen BV, Dalgaard M, Leffers H. Differential display competitive polymerase chain reaction: An optimal tool for assaying gene expression. *Electrophoresis* 1999; 20:230-240.

Ju H, McDixon I. Extracellular matrix and cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 1996; 12 (12):1259-1267.

Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan TJ, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 1994, 89:2809-2815.

Kannel WB. Overview of Atherosclerosis. *Clin Ther* 1998; 20, Supp. B:B2-17.

Kennedy SH, Rouda S, Qin H, Aho S, Selber J, Tan EML: Basic FGF Regulates Interstitial Collagenase Gene Expression in Human Smooth Muscle Cells. *J Cell Biochem* 1997; 65:32-41.

Klues HG, Radke PW, Hoffmann R, vom Dahl J. Mechanismen und Therapiekonzepte der Stentstenose. *Herz* 1997; 22:322-334.

Kohler N, Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth promoting activity. *Exp Cell Res* 1974; 87:297-301.

Kreis T, Vale R. Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. London: Oxford University Press 1993; 66.

Langman J. Medizinische Embryologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 8. Auflage 1989; 193-197.

Lamphear B, Kirchweger R, Skern T, Rhoads R. Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornal proteases; implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. J Biol Chem 1995; 268:19200-19203.

Leonhardt H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1990, 124-125.

Levy-Strumpf N, Deiss LP, Berissi H, Kimchi A. DAP-5, a novel homologue of the translation initiation factor 4G, isolated as a putative modulator of interferon- γ -induced programmed cell death. Mol Cell Biol 1997; 3:1615-1625.

Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J 1993; 7:737-743.

Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. Circ Res 1991; 68:106-113.

Lobstein JF. Lehrbuch der pathologischen Anatomie. 2. Band. Stuttgart: Brodhagsche Buchhandlung, 1835.

Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. Prog Cardiovasc Dis 1995; 38:87-104.

Lundgren E, Gullberg D, Rubin K, Borg TK, Terracio MJ, Terracio L. In vitro studies on adult cardiac myocytes: attachment and biosynthesis of collagen type IV and laminin. *J Cell Physiol* 1988; 136:43-53.

Majesky MW, Reidy MA, Bowen-Pope DF, Hart CE, Wilcox JN, Schwartz SM. PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. *J Cell Biol* 1990; 111:2149-2158.

Martin DP, Schmidt RE, DiStefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 1988; 106:829-844.

Mathieu-Daudé F, Trenkle T, Welsh J, Jung B, Vogt T, McClelland M. Identification of Differentially Expressed Genes Using RNA Fingerprinting by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *Methods in Enzymology* 1999; 303:309-324.

McClelland M, Mathieu-Daudé F, Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet* 1995; Vol.11, No.6:242-246.

McClelland M, Ralph D, Cheng R, Welsh J. Interactions among regulators of RNA abundance characterized using RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Nucleic Acids Res*, 1994a; 21:4419-4431.

McClelland M, Welsh J. RNA Fingerprinting by Arbitrarily Primed PCR. *PCR Methods Applic* 1994b; 4:66-81.

Mulder HJGH, Egbert TB, Jukema JW, Zwinderman AH, Schalij MJ, van Boven AJ, Bruschke AVG. Pravastatin reduces Restenosis two years after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (REGRESS Trial). *Am J Cardiol* 2000; 86:742-746.

Muller DWM. The Role of Proto-oncogenes in Coronary Restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 2:117-128.

Müller-Ladner U, Judex M, Jüsten HP et al.. Analyse des Genexpressionsmusters von synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis mittels RAP-PCR Differential Display. *Med Klin* 1999; 94:228-232.

Mutschler E. Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1996; 467-489.

Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zahn X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; 362:844-846.

Nakayama DK, Geller DA, Lowenstein CJ, Davies P, Pitt BR, Simmons RL, Billiar TR. Cytokines and lipopolysaccharides induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7:471-476.

Newby AC, George SJ. Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies. *Cardiovasc Res* 1993; 27:1173-1183.

Orford JL, Selwyn AP, Ganz P, Popma JJ, Rogers C. The comparative Pathobiology of Atherosclerosis and Restenosis. *Am J Cardiol* 2000; 86(suppl):6H-11H.

Pain VM. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 1996; 236:747-771.

Palmaz JC, Richter GM, Noeldge G, Schatz RA, Robison PD, Gardiner GA, Becker GJ, McLean GK, Denny DF, Lammer J et al.. Intraluminal stents in atherosclerotic iliac artery stenosis: preliminary report of a mulitcenter study. *Radiology* 1988; 168:727-731.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric Oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.

Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick WC, Sonenberg N. Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF4A define a critical role for eIF4F in cap-dependent and cap-independent initiation. *EMBO J* 1994; 13:1205-1215.

Pollman MJ, Yamada T, Masatsugu H, Gibbons GH. Vasoactive Substances Regulate Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis. *Circ Res* 1996, Vol.79, 4:748-756.

Polunovsky VA, Rosenwald IB, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF α : modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res*. 1994; 214:584-594.

Post M, Borst C, Kuntz RE. The Relative Importance of Arterial Remodeling compared with Intimal Hyperplasia in Lumen Renarrowing after Balloon Angioplasty. *Circulation* 1994; 89:2816-2821.

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 1999; 18:270-279.

Raff T, van der Giet M, Endemann D, Wiederholt T, Paul M. Design and Testing of β -Actin Primers for RT-PCR that do not co-amplify processed Pseudogenes. *BioTechniques* 1997; 23: 456-460.

Rogers C, Parikh S, Seifert P, Edelman ER. Endogenous cell seeding: remnant endothelium after stenting enhances vascular repair. *Circulation* 1996; 94:2909-2914.

Ross R, Masuda J, Raines EW, Gown AM, Katsuda S, Sasahara M, Malden LT, Masuko H, Sato H. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science* 1990; 248:1009-1012.

Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46:155-169.

Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:1207-1210.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schlegel J, Vogt T, Mönkel K, Rüschoff J. DNA Fingerprinting of Mammalian Cell Lines Using Nonradioactive Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR). *BioTechniques* 1996; 20:178-180.

Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992; 9:383-391.

Schroeder S, Baumbach A, Haase KK, Oberhoff M, Marholdt H, Herdeg C, Athanasiadis A, Karsch KR. Reduction of restenosis by vessel size adapted percutaneous transluminal coronary angioplasty using intravascular ultrasound. *Am J Cardiol* 1999; 83:875-879.

Schwartz L, Bourassa MG, Lesperance J, Aldridge HE, Kazim F, Salvatori VA, Henderson M, Bonan R, David PR. Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1988; 318(26):1714-9.

Schwartz RS. Pathophysiology of Restenosis: Interaction of Thrombosis, Hyperplasia and/or Remodeling. *Am J Cardiol* 1998; 81(7A):14E-17E.

Schwartz SM. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 1997; 100:S87-S89.

Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* 1994; 75:650-658.

Strecker EP, Liermann D, Barth KH, Wolf HRD, Freudenberg N, Berg G, Westphal M, Tsikuras P, Savin M, Schneider B. Expandable tubular stents for treatment of arterial occlusive diseases: experimental and clinical results. Work in progress. *Radiology* 1990; 175:97-102.

Stumm G, Vedder H, Schlegel J. A simple method for isolation of PCR fragments from silver stained polyacrylamide gels by fine needle scratching. Elsevier Trends Journals Technical Tips Online 1997; 50168-9525 (97) 01115-3.

Sundaresan V, Roberts I, Bateman A, Bankier A, Sheppard M, Hobbs C, Xiong J, Minna J, Latif F, Lerman M, Rabbitts P. The DUTT1 Gene, a Novel NCAM Family Member is Expressed in Developing Murine Neural Tissues and Has an Unusually Broad Pattern of Expression. *Molecular and Cellular Neuroscience* 1998; 11:29-35.

Tai JTN, Brooks EE, Shoudan L, Somogyi R, Rosete JD, Lawn RM, Shiffman D. Determination of Temporal Expression Patterns for Multiple Genes in the Rat Carotid Artery Injury Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2184-2191.

Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 1995; 281:421-433.

Thyberg J, Blomgren K, Roy J, Tran PK, Hedin U. Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells after Arterial Injury is Associated with Changes in the Distribution of Laminin and Fibronectin. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:837-846.

Topper JN. Genes, Matrix and Restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2173-2174.

Westermarck B, Siegbahn A, Heldin CH, Claesson-Welsh L. B-type receptor for platelet-derived growth factor mediates a chemotactic response by means of ligand-induced activation of the receptor protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:128-132.

Wilcox JN. Analysis of local gene expression in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Trends Cardiovasc Med* 1991; 1:17-24.

Yamanaka S, Poksay KS, Arnold KS, Innerarity TL. A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev* 1997; 11:321-333.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276:1268-1272.

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. K.J. Klose danke ich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der molekularbiologischen Forschung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Alfke, Herrn Prof. Dr. J. Schlegel und Frau Dr. G. Stumm für die engagierte und fürsorgliche Beratung und Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen und methodischen Problemen sowie bei der Abfassung der Dissertation.

Frau B. Kleb, Herrn G. Piontek und Frau G. Bortolussi danke ich für die ständige Hilfe und Unterstützung bei den technischen Arbeiten.

10 LEBENS LAUF

Name: Schnieder, geb. Hoene
 Vorname: Ina Elisabeth Maria
 Geburtsdatum: 09.07.1970
 Geburtsort: Köln
 Familienstand: verheiratet

1976-1980 Grundschule Neustadt, Leverkusen

1980-1986 Landrat-Lucas-Gymnasium, Leverkusen

1986-1987 Mt. Lebanon High School, Pennsylvania, USA

1987-1989 Landrat-Lucas-Gymnasium, Leverkusen, Abitur 1989

1989-1992 Ausbildung zur Industriekauffrau/Wirtschaftsassistentin, IHK, Bayer AG, Leverkusen

1992-1998 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität, Marburg

1996-1998 Mitarbeit in den Arbeitsgruppen für Molekular- und Neuropathologie, sowie vaskuläre Biologie der Abteilung für Strahlendiagnostik

Thema: Evaluation der Genexpression unterschiedlich stimulierter vaskulärer boviner Muskelzellen

Veröffentlichung der Ergebnisse: VASA August 1999

1998-1999 Praktisches Jahr im Stadtkrankenhaus Soest, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Münster, Wahlfach Pädiatrie

06.1999-05.2000 Ärztin im Praktikum in der Inneren Abteilung, Cusanus Krankenhaus, Bernkastel-Kues

06.2000 bis 11.2000 Ärztin im Praktikum in der Chirurgischen Abteilung, Elisabeth Krankenhaus, Mayen

seit 02.2001 Assistenzärztin in der Inneren Abteilung, Maria Hilf Krankenhaus, Daun

AKADEMISCHE LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg an der Lahn waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Austermann, Aziz, Basler, Bauer, Baum, Beato, Berendes, Berger, Bernhardt, Besedovsky, Bien, Blankenburg, Braasch, Cetin, Daume, Daut, Dibbets, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Erhardt, Engel, Eschenbach, Friederich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Garten, Gemsa, Geus, Göke, Golenhofen, Gotzen, Graul, Gressner, Griss, Gröne, Grundner, Grzschik, Habermehl, Happle, Hardewig, Hartmann, Hasilik, Havemann, Hebebrand, Hennis, Hering, Herpertz-Dahlmann, Heß, Hildebrandt, Hilgermann, Hoffmann, Huffmann, Ihm, Jacob, Janke, Jones, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klötzer, Klose, Knauff, Knoll, Koransky, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Küster, Kuni, Lang, Lange, Lauer, Lehmann, Lennartz, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Lührmann, Lütcke, Maisch, Martini, Massarat, Mennel, Moosdorf, Mueller, Müller, Netter, Neurath, Niemeyer, Niessing, Oepen, Oertel, Petry, Pieper, Pohlen, Portig, Radsak, Rehder, Remschmidt, Riedmiller, Rodeck, Rosemann, Rothmund, Rupec, Schäfer, Schachtschabel, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schneider, Schumacher, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seybert, Slenczka, Stachniss, Steininger, Stempel, Sturm, Thomas, Voigt, Weber, Weihe, Wesemann, v. Wichert, Wiegandt